

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Medicina



**“ALERGIA A LECHUGA: PATRONES CLÍNICOS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS
ALÉRGENOS”**

TESIS DOCTORAL

Esther Muñoz García

Madrid, 2017

Vº Bº Directores de Tesis:

Dr. Carlos Pastor Vargas

Dr. Fernando Vivanco Martínez

Dra. Olga Luengo Sánchez

Tutor de Tesis:

Dr. Joaquín Sastre Domínguez

A mis hijos Guillermo y Alexia

A Alberto

“No basta dar pasos que un día puedan conducir hasta la meta, sino que cada paso ha de ser una meta, sin dejar de ser un paso”

Johann P. Eckermann

Doña Olga Luengo Sánchez, Facultativo especialista del Servicio de Alergia del Hospital Universitario Vall d'Hebron, Don Fernando Vivanco Martínez, Profesor Titular de la Universidad Complutense de Madrid y Don Carlos Pastor Vargas, Investigador en el Instituto de Investigaciones Sanitarias Fundación Jiménez Díaz.

CERTIFICAN

Que Doña Esther Muñoz García, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Barcelona, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Alergia a lechuga: Patrones clínicos y caracterización de nuevos alérgenos." que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 21 de junio de 2017.

Los directores de la tesis

Dra. Olga Luengo Sánchez

Dr. Fernando Vivanco Martínez

Dr. Carlos Pastor Vargas

Agradecimientos

A mis padres, Paco e Isabel.

A mi hermano Javi, a Sandra y sobre todo a Paula.

A Emilio y a Rosa por cuidar tan bien de las lechugas.

A Ana, Paula y Lidia.

A Olga Luengo, porque sin su “exigencia”, su “insistencia” y lo más importante sin su ayuda, correcciones y consejos esta tesis no hubiera sido posible.

A Carlos Pastor, por introducirme en el maravilloso mundo del “Labo”, por acogerme de recién llegada y por su enseñanza, su paciencia y sus correcciones para poder sacar adelante esta tesis.

A Fernando Vivanco, por dejarme investigar en su Laboratorio de Inmuno-Alergia y Proteómica y dirigir esta tesis.

A Aroa Sanz, por qué sin ella los “Blots de lechuguita” no habrían salido tan bien.

A Manolo de las Heras, por su primera lechuga.

A Javier Cuesta, por sus múltiples y sabios consejos.

A Joaquín Sastre, por darme la oportunidad de demostrar que me encanta ser alergóloga e investigadora.

A Vicky, Moisés y Núria porque sin la ayuda de Valle tampoco hubiese sido posible.

A Anna, María y Olga por seguir arreglando el mundo conmigo.

A las “chicas del Labo”: Gloria, Marta, Irene, María....porque aunque sea “médico” no lo “parezco”.

A mis “amigos de verdad”.

A todos los que vais a leer esta tesis.

ABREVIATURAS

AINEs: antiinflamatorios no esteroideos.

CEFA: Alergia alimentaria mediada por cofactor

CRD: Diagnóstico por componentes

DBPCFC: Provocación oral a doble ciego controlada con placebo

ELISA: enzima inmunoensayo (Enzyme-linked immunoabsorbent assay)

IgE: Inmunoglobulina E.

ITA: Inmunoterapia con alérgenos.

kDa: Kilodalton

LTP: Proteína de Transferencia de lípidos.

LC-MS/MS: Cromatografía líquida- espectrometría de masas en tandem

MS/MS: Espectrometría de masas en tandem

OH: alcohol.

PEOC: Prueba de exposición oral controlada

PM: Peso molecular.

RC: Reactividad cruzada.

SAO: síndrome de alergia oral

sIgE: IgE específica

SPT: skin prick-test

SPPT: skin prick-prick test.

TLP: taumatina (thaumatin-like protein).

RESUMEN

Introducción: Cerca del 2–8% de la población de los países industrializados presenta algún tipo de alergia alimentaria, cuyos síntomas varían desde síntomas localizados confinados a la mucosa oral hasta reacciones anafilácticas de gravedad. Consumida mundialmente, la lechuga puede provocar reacciones alérgicas. A día de hoy, a pesar de esto, sólo se ha descrito una proteína de transferencia de lípidos (LTP) en los pacientes con reacciones alérgicas a lechuga. La sensibilización a la LTP es la causa más frecuente de alergia alimentaria en el área mediterránea, siendo la alergia al melocotón el sensibilizador primario en la mayoría de los casos. La alergia a la lechuga ha sido descrita como una manifestación frecuente en los pacientes que sufren síndrome de LTP.

Objetivo: El objetivo fue identificar los potenciales nuevos alérgenos implicados en la alergia a lechuga e investigar la frecuencia del síndrome de LTP en una muestra de pacientes alérgicos a lechuga y evaluar su patrón clínico.

Métodos:

Los sujetos fueron seleccionados entre los pacientes que consultaban por síntomas compatibles con alergia alimentaria tras la ingesta de lechuga en las consultas externas de Alergia de los Servicios de Alergia del Hospital Universitario de Vall d'Hebron (Barcelona) y Fundación Jiménez Díaz (Madrid). La detección de bandas fijadora de IgE se detectaron por SDS-PAGE y Western blot. La caracterización molecular de las bandas se realizó por espectrometría de masas. La taumatina de lechuga se purificó usando el sistema Agilent 3100 OFFGEL. Se determinó la IgE específica a Pru p 3 y a lechuga. Se evaluaron los síntomas con otras LTPs de alimentos de origen vegetal y la presencia de cofactores.

Resultados:

Se incluyeron un total de 42 pacientes en cuyos sueros se identificaron los alérgenos principales del extracto de lechuga. Las bandas fijadoras de IgE reconocidas en suero por más del 50% de los pacientes se identificaron como una LTP (9 kDa), una taumatina (26 kDa), y una aspartil proteasa (35 y 45 kDa). Los estudios de ELISA inhibición se realizaron para confirmar la capacidad fijadora de la IgE de los alérgenos purificados. Los síntomas clínicos de la alergia a lechuga fueron frecuentemente graves, un 60% de los pacientes experimentaron anafilaxia y en prácticamente la mitad de los casos (43%) había algún cofactor implicado en la reacción. Además, el 96.6% de los pacientes estaban sensibilizados a melocotón y habían experimentado síntomas con otros alimentos vegetales, considerándose que presentaban síndrome de LTP y un 90% estaban sensibilizados a pólenes.

Conclusiones: La alergia a la lechuga más que de forma aislada, ocurre en el contexto del síndrome LTP y se caracteriza por su frecuente asociación a cofactores y la gravedad de sus reacciones. Se han identificados y caracterizado dos nuevos alérgenos mayoritarios de lechuga, una taumatina y una aspartil proteasa. Estos alérgenos pueden ser usados para mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento de los pacientes alérgicos a lechuga.

SUMMARY

Scope-Background: Today, about 2–8% of the population of Western countries exhibits some type of food allergy whose impact ranges from localized symptoms confined to the oral mucosa to severe anaphylactic reactions. Consumed worldwide, lettuce is a Compositae family vegetable that can elicit allergic reactions. To date, however, only one lipid transfer protein has been described in allergic reaction to lettuce. Lipid transfer protein (LTP) sensitization is the most common cause of food allergy in the Mediterranean area, with peach allergy acting as the primary sensitizer in most cases. Lettuce has been described as a common offending food in patients with LTP syndrome.

Objectives: The aim of this study was to identify potential new allergens involved in lettuce allergy and to investigate the frequency and clinical expression of LTP syndrome in a sample of lettuce allergic patients.

Methods: Patients with symptoms after lettuce ingestion were selected at the Allergy Services of Hospital Universitario de Vall d'Hebron (Barcelona) and Fundación Jiménez Díaz (Madrid). IgE-binding proteins were detected by SDS-PAGE and immunoblotting. Molecular characterization of IgE-binding bands was performed by MS. Thaumatin was purified using the Agilent 3100 OFFGEL system. We determined specific IgE to Pru p 3 and lettuce. Symptoms elicited by other LTP-containing plant-derived foods and the presence of cofactors were assessed.

Results: A total of 42 patients were included, and in whose sera were identified the main allergens of lettuce extract. The IgE-binding bands recognized in the sera of more than 50% of patients were identified as lipid transfer protein (9 kDa), a thaumatin-like protein (26 kDa), and an aspartyl protease (35 and 45 kDa). ELISA inhibition studies were performed to confirm the IgE reactivity of the purified allergen. The clinical symptoms of lettuce allergy were frequently severe, with 60% patients experiencing anaphylaxis and in almost half of cases (43%) cofactors were involved in the clinical reactions. Moreover, 96.6% of patients were sensitized to peach and had experienced previously symptoms with other plant-derived foods, thus considered to have a LTP syndrome. Sensitization to pollens was found in 90% of patients.

Conclusions: Lettuce allergy is found not as an isolated condition but in the context of LTP syndrome and it is characterized by severe reactions and frequent cofactor association. Two new major lettuce allergens—a thaumatin-like protein and an aspartyl protease—have been

identified and characterized. These allergens may be used to improve both diagnosis and treatment of lettuce-allergic patients.

ÍNDICE

Agradecimientos	9
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN	13
SUMMARY	15
ÍNDICE.....	19
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1 Alergia a alimentos.....	27
1.2. Epidemiología.....	28
1.3. Manifestaciones clínicas	29
1.3.1. Manifestaciones cutáneas:.....	30
1.3.2. Síndrome de Alergia Oral (SAO):	30
1.3.3. Síntomas digestivos:.....	30
1.3.4. Anafilaxia:.....	30
1.3.5. Anafilaxia dependiente de alimento inducida por cofactores:	30
1.4. Diagnóstico alergia alimentaria.....	31
1.4.1. Historia clínica	31
1.4.2. Pruebas cutáneas intraepidérmicas o prick test (SPT).....	31
1.4.3 Detección de IgE específica en suero	32
1.4.4. Diagnóstico molecular	32
1.4.5. Provocación oral con el alimento	33
1.5. Tratamiento.....	34
1.6 Alérgenos alimentarios	35
1.7 Vías de sensibilización	36
1.7.1. Alergia alimentaria de clase I:.....	36

1.7.2. Alergia alimentaria de clase II:.....	36
1.7.3. Alergia alimentaria clase III:.....	36
1.8. Reactividad Cruzada	37
1.9. Panalérgenos.....	38
1.9.1 LTP (PR-14)	38
1.9.2. Taumatinas (PR-5)	41
1.9.3. Profilinas.....	43
1.10. Síndromes pólenes-alimentos vegetales	44
1.10.1. Síndromes polen-alimentos por sensibilización a LTP.	45
1.11.- Síndrome LTP	46
1.12. Alergia a la lechuga	48
1.12.1 Lechuga. Familia botánica	48
1.12.2 Variedades y consumo	49
1.12.3 Epidemiología de la alergia a la lechuga:	50
1.12.4 Alérgenos de lechuga	50
1.12.5 Clínica	51
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	54
2.1. HIPÓTESIS	56
2.2. OBJETIVOS	56
3. MATERIAL Y MÉTODOS	58
3.1 Selección de pacientes	60
3.2. Extracción sanguínea y conservación de muestras.....	60
3.3. Cuestionario clínico-epidemiológico.....	61
3.4 Pruebas cutáneas (SPT y SPPT).....	61
3.5. Determinación de IgE total y específica.....	64
3.6. Determinación de IgE específica a un panel de alérgenos purificados por microarray...	64
3.7 Pruebas de provocación	65

3.8 Estudios inmunológicos.....	65
3.8.1. Listado de soluciones tampones:.....	65
3.8.2. Preparación del extracto de lechuga.....	66
3.8.3. Cuantificación de proteínas.....	66
3.8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	66
3.8.5 Ensayo de inmunodetección.....	67
3.8.6. Estudio de Proteómica.....	68
3.8.7- Enzimoinmunoensayo (ELISA).....	68
3.9 Análisis estadístico	70
4. RESULTADOS	72
4.1. Pacientes	74
4.2. Cuestionario clínico-epidemiológico.....	74
4.3 Pruebas cutáneas	76
4.3.1. Pruebas cutáneas con lechuga	76
4.3.2. Pruebas cutáneas con extractos comerciales de alimentos.....	78
4.3.3. Pruebas cutáneas con extracto de pólenes.....	79
4.4 Determinación de IgE total y específica frente a lechuga y a un panel de alérgenos purificados por microarray:.....	80
4.5. Pruebas de Provocación	81
4.6. Estudio Inmunológico.....	82
4.6.1.- Extracto a de lechuga.....	82
4.6.2. Ensayos de Inmunodetección (Western blot).....	83
4.6.3 Estudios de Proteómica.....	85
4.6.4. ELISA y ELISA Inhibición	88
4.6.5. Reactividad cruzada entre lechuga y TLP de melocotón.....	89
5. DISCUSIÓN.....	92
5.1. Características clínicas de la alergia a lechuga.....	94

5.2. Caracterización de los alérgenos de lechuga.	100
5.2.1 Alérgenos descritos en lechuga:	101
6. CONCLUSIONES.....	108
CONCLUSIONES:	110
ANEXOS.....	112
ANEXO 1. Comité Ética	113
ANEXO 2. Cuestionario clínico-epidemiológico.....	114
ANEXO 3.- Trabajos publicados durante la realización de la tesis doctoral	119
ANEXO 4. Artículos publicados relacionados con la tesis doctoral	120
BIBLIOGRAFÍA.....	134



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Alergia a alimentos

En los últimos años las consultas por alergia a alimentos han aumentado de manera exponencial en los servicios de Alergología [1], por lo que se han publicado multitud de artículos de revisión y guías de consenso que tienen como objetivo proporcionar un correcto abordaje diagnóstico y terapéutico de los pacientes con alergia alimentaria.

En el año 1995 la EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) [2] crea el primer grupo de consenso sobre la clasificación, y definen la *reacción adversa* a alimentos como aquella reacción anómala producida por la ingestión de un alimento. Según el mecanismo responsable se clasificaban en “*reacciones tóxicas*”, que son aquellas que pueden afectar a cualquier individuo cuando el alimento se administra en dosis suficiente, y en “*reacciones no tóxicas*”, en las que la reacción depende de una susceptibilidad individual. Dentro de las “no tóxicas” se englobaría la *alergia*, que estaría mediada por mecanismos inmunológicos y la *intolerancia* que no estaría mediada por éstos.

En el año 2001 la EAACI crea un nuevo documento de posicionamiento revisando el anterior de 1995 y establece una nueva nomenclatura [3] en la que cualquier reacción adversa tras la ingesta de un alimento pasa a denominarse “*hipersensibilidad al alimento*” que si es debida a mecanismo no inmunológico se denomina “*hipersensibilidad no alérgica*” y si está implicado mecanismo inmunológico se denomina “*hipersensibilidad alérgica*”; dentro de ésta última se dividían en mediadas por IgE (en las que se producen por anticuerpos IgE específicos frente a un proteínas específicas de un alimento confirmado por pruebas *in vitro* y/o *in vivo*) y no mediadas por IgE. En el año 2003 el Comité de nomenclaturas de la WAO (World Allergy Organization) [4] refrendó esta última nomenclatura.

En el año 2010 Boyce y col [5] del NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA), realizan una definición más actual refiriéndose a la alergia a alimentos como un “efecto adverso en la salud que surge de una respuesta inmunológica específica que se reproduce tras la exposición a un alimento”. Clasifican las reacciones alérgicas a alimentos en cuatro categorías según el mecanismo inmunológico [5] [6], mediadas por IgE, mixtas (mediadas por IgE/células), no mediadas por IgE y mediadas por células (véase Figura 1).

Tanto en la clasificación de la WAO como en la de la NIAID definen la alergia alimentaria mediada por IgE, como aquella reacción adversa en la que la presencia de anticuerpos IgE específicos frente a proteínas específicas de un alimento se correlacionan con los síntomas del paciente y con la reproducción de los síntomas tras una nueva exposición al alimento.

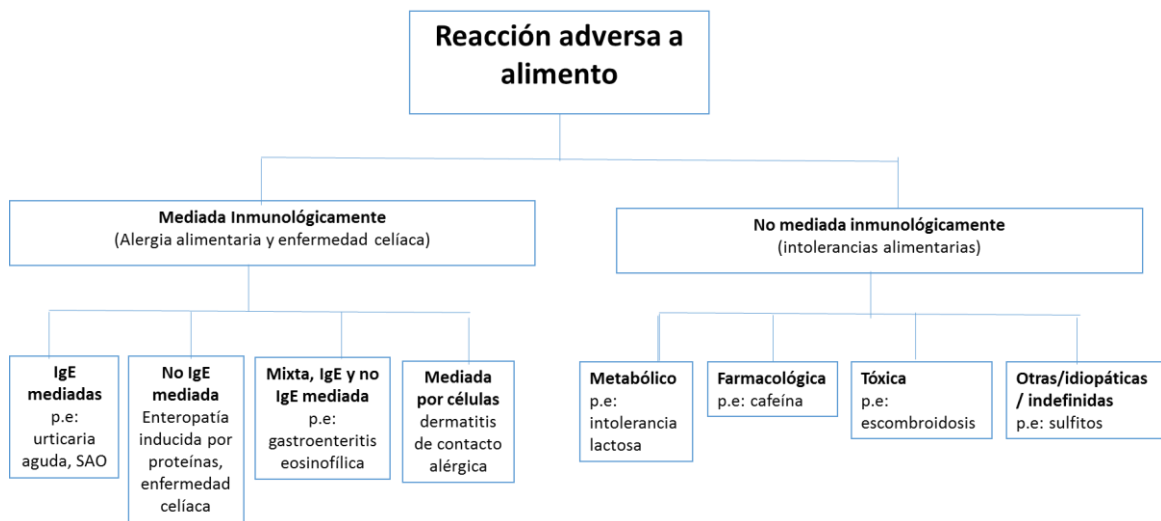


Figura 1. Clasificación de la Alergia alimentaria tomada de Boyce [5]

La alergia alimentaria mediada por IgE, objeto del presente estudio, es la forma más común de alergia alimentaria. Se caracteriza clínicamente por la rápida aparición de los síntomas (generalmente inmediatos, en menos de 1 hora), afectación de órganos como piel, tracto respiratorio, gastrointestinal o sistema cardiovascular y por ser reproducible tras la nueva exposición al alimento. Su diagnóstico se realiza detectando la IgE específica frente al alimento, ya sea in vivo (mediante la realización de pruebas cutáneas) o in vitro (detección de IgE específica sérica) [7] [8] [9].

1.2. Epidemiología

La prevalencia de la alergia alimentaria se ha incrementado en las últimas décadas según confirman varios estudios, que se sitúa en torno al 2-4% en adolescentes y adultos y el 5-6% en niños [10] [11] [12], existiendo una importante heterogeneidad entre los diversos estudios publicados sugiriendo importantes diferencias metodológicas y de diagnóstico entre ellos.

El estudio Alergológica [1], realizado en España publicado en el año 2005 describe las características de los pacientes alérgicos a alimentos atendidos en consultas de alergia en nuestro país. La alergia a los alimentos se diagnosticó en 7,4% de los pacientes adultos, mientras que en Alergológica del año 1999 fue del 3.6%, lo que confirmaría esta tendencia.

En cuanto al género y edades, la alergia alimentaria es más frecuente en niños que en adultos, en edad pediátrica más frecuente en niños que en niñas y en adultos más frecuentes en

INTRODUCCIÓN

mujeres que en hombres. En Alergológica se comprobó que la alergia alimentaria fue más frecuente en mujeres, afectando al 54.9%.

Los alimentos responsables del mayor número de reacciones alérgicas en los niños son la leche, el huevo y el pescado, mientras que en los adultos destacan los alimentos de origen vegetal [13] [1] [14]. En el estudio epidemiológico de alergia alimentaria en España [1], se describió que los alimentos implicados con mayor frecuencia en menores de 5 años fueron leche y huevo y en adultos fueron las frutas (33,3%) seguidas de frutos secos (26%). Entre las frutas, las rosáceas indujeron el 23,6% de las reacciones y respecto a las hortalizas estuvieron implicadas en más del 7%.

El tipo de alimento vegetal relacionado con más frecuencia con alergia a alimentos varía en función de las distintas áreas geográficas, probablemente por los diferentes hábitos de consumo y diferente exposición a distintas cargas polínicas [13] [15] [16] [17]. En el norte y centroeuropa es más frecuente la alergia a la manzana [18], mientras que en el Reino Unido es el cacahuete [6] y en España el melocotón [1] [19]. En el estudio epidemiológico realizado en once países europeos, Euro Prevall [20], se objetivó que la media de la prevalencia a melocotón en Europa fue del 8% y en España del 11.3%.

Diferentes estudios epidemiológicos [21] [1] sobre población española han confirmado la alergia a frutas rosáceas, y dentro de éstas el melocotón, como la alergia alimentaria más frecuente.

En España las hortalizas que más frecuentemente provocan síntomas son la lechuga y el tomate [22] [23] [24]. En cuanto al tomate la mayoría de pacientes sensibilizados son asintomáticos o bien presentan síndrome de alergia oral (SAO) y se ha descrito su frecuente relación con la sensibilización al polen de gramíneas por profilinas [25]. En cuanto a lechuga sus características se expondrán ampliamente en el punto 1.12.

El presente trabajo se centrará en alergia alimentaria en adultos, siendo los alimentos vegetales los responsables del mayor número de reacciones.

1.3. Manifestaciones clínicas

Los síntomas que presentan los pacientes con alergia alimentaria se desarrollan característicamente de minutos a pocas horas tras la ingesta del alimento y pueden variar

desde síntomas leves hasta síntomas moderados y graves y en algunos casos pueden llegar a ser potencialmente mortales [16]:

1.3.1. Manifestaciones cutáneas: En el caso de afectar a la piel, pueden presentarse desde urticaria aguda y angioedema, que se producen rápidamente tras la ingesta del alimento y que es la manifestación frecuente de la alergia a alimentos, hasta presencia de picor, eritema o urticaria en la zona de contacto con el alimento.

1.3.2. Síndrome de Alergia Oral (SAO): Prurito orofaríngeo que se produce de forma inmediata tras la ingesta del alimento. Pueden aparecer lesiones peribucales y en ocasiones incluso ligero edema de labios o picor ótico [26] [27]. Usualmente se produce con frutas o vegetales crudos y suele afectar de forma más frecuente a pacientes alérgicos a pólenes. Es la manifestación clínica más frecuente de alergia alimentaria en pacientes adultos [28].

1.3.3. Síntomas digestivos: Vómitos (con o sin diarrea) y dolor abdominal, de forma aislada [29] [23] o precediendo a un cuadro clínico de anafilaxia. Recientemente se ha descrito un fenotipo de alergia alimentaria con síntomas exclusivamente gastrointestinales, que en el caso de la alergia a proteínas de leche de vaca, se ha asociado con la sensibilización a β -lactoglobulina [30].

1.3.4. Anafilaxia: según la Guía Galaxia de actualización sobre anafilaxia, se define ésta como aquella reacción alérgica grave de instauración rápida y potencialmente mortal [31], en la que se produce afectación de varios órganos o sistemas [32]. Las reacciones anafilácticas también han aumentado en las últimas décadas [33] [34] [35], a expensas de alimentos [1] [36] [37].

1.3.5. Anafilaxia dependiente de alimento inducida por cofactores:

Se entiende por cofactor a aquel factor independiente del alérgeno que modula las manifestaciones clínicas de la reacción alérgica, bien disminuyendo el umbral de la reacción o provocando síntomas más graves influyendo directamente en los mecanismos de la reacción alergia tipo I (mediada por IgE). Se estima que en un 30% de las reacciones anafilácticas está implicado un cofactor [38].

La ingesta del alimento puede ser tanto horas previas como varias horas después de la presencia concomitante del cofactor [39]. En algunas ocasiones los alimentos son tolerados en ausencia del cofactor y en otras los síntomas en ausencia de cofactor son más leves y en su presencia son frecuentes las reacciones anafilácticas [38] [40] [41].

Los cofactores más importantes descritos son el ejercicio físico, cuyo cuadro más característico es la anafilaxia por ingesta de trigo dependiente de ejercicio, el alcohol y los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) [42] [43] [44] [24].

Mientras que la omega-5 gliadina ha sido el alérgeno más frecuentemente implicado en la anafilaxia por ingesta de trigo dependiente de ejercicio, diversos estudios han confirmado que la proteína de transferencia de lípidos (LTP) es el alérgeno más frecuentemente implicado en las reacciones anafilácticas exacerbadas por cofactor en el área mediterránea [24] [41].

1.4. Diagnóstico alergia alimentaria

El diagnóstico de alergia alimentaria se basa en una historia clínica detallada y la demostración de IgE específica frente al alimento causante de la reacción [7] [8] [9].

1.4.1. Historia clínica

En la anamnesis detallada se debe recoger la relación temporal entre la ingesta del alimento y la aparición de los síntomas, la gravedad de la reacción, la presencia de cofactores, una historia previa de polinosis y la tolerancia o no a otros alimentos relacionados.

1.4.2. Pruebas cutáneas intraepidérmicas o prick test (SPT).

Las pruebas cutáneas intraepidérmicas (SPT) se utilizan para la demostración de anticuerpos IgE específicos frente al alimento sospecho. Se realizan siguiendo los métodos propuestos por Malling [45] con nuevas actualizaciones [46]. Son la principal prueba diagnóstica en alergia alimentaria ya que son fáciles de realizar, presentan bajo coste y son seguras. Se utilizan para su realización extractos comerciales de alimentos junto con un control positivo (histamina) y otro negativo (suero fisiológico). La lectura se realiza a los 15 minutos, considerándose positivas aquellas que presentan una pápula de diámetro 3mm mayor que la obtenida con el control negativo [47]. Se consideran más sensibles y con mayor valor pronóstico negativo que la IgE específica.

La elección de unos extractos de alta calidad es fundamental para el correcto diagnóstico. En ocasiones existe escasa representación en los extractos comerciales de determinados alérgenos lábiles que pueden alterarse por procesos como el calor, por lo que se necesitarían condiciones especiales de extracción, lo que disminuye la sensibilidad de la prueba. En esos casos es preferible el **método del SPPT (skin prick-prick test)** que se realiza con el alimento en

fresco en pinchando con la misma lanceta primero el alimento e inmediatamente después la piel del paciente [8] [9] [7] [48] [49].

1.4.3 Detección de IgE específica en suero

La demostración de IgE específica frente al alimento sospechoso también se puede realizar in vitro. La determinación de IgE específica sérica es de especial utilidad cuando no es posible realizar las pruebas cutáneas o cuando su interpretación es difícil por la coexistencia de dermatopatías. Para algunos alimentos se han definido puntos de corte con valor predictivo que varían de una población a otra [50] y se ha propuesto que el ratio IgE específica/ IgE total puede tener valor para predecir el resultado de una prueba de provocación específica, en particular para alergia persistente a frutos secos, semillas y marisco [51].

1.4.4. Diagnóstico molecular

El gran avance que se ha producido en la caracterización de alérgenos en los últimos años, ha permitido conocer los perfiles de sensibilización a los distintos alérgenos de una fuente alérgica [52] [53], lo que tiene un importante valor diagnóstico y pronóstico, es lo que se ha denominado diagnóstico por componentes (CRD) [54] [55]. El diagnóstico molecular nos ayuda a distinguir entre los pacientes sensibilizados a alérgenos específicos de una determinada fuente alérgica (sensibilización genuína) de los de reactividad cruzada [56] reconociendo a los alérgenos desencadenantes [57]. Permite evaluar el riesgo de los que presentarán reacción alérgica leve de aquellos que puedan presentar reacciones potencialmente de gravedad [58] [54] [59], disminuyendo también la necesidad de someter a los pacientes a pruebas de provocación con riesgo. Identifica además los alérgenos desencadenantes que serán de ayuda para una correcta inmunoterapia específica con alérgenos.

El diagnóstico molecular se puede realizar con la determinación de IgE a componentes individuales o en micromatrices de alérgenos que permiten realizar determinaciones de IgE específica de forma simultánea a múltiples alérgenos. Actualmente se dispone de forma comercial del ISAC, que permite determinar de forma simultánea 112 componentes de 51 fuentes alérgicas con una mínima cantidad de suero (30 µl).

En los últimos años se han publicado artículos [60] [61] [62] [55] que ayudan al correcto manejo e interpretación de los datos proporcionados por el ISAC.

1.4.5. Provocación oral con el alimento

En el caso en que el conjunto de anamnesis, SPT, IgE específicas y CRD no arroje datos claros sobre la relación causa-efecto, es cuando es precisa la realización de las pruebas de provocación con el alimento implicado.

Guías europeas y americanas recomiendan la prueba de exposición oral con el alimento (PEOC) y en particular la provocación oral a doble ciego controlada con placebo (DBPCFC) como el patrón oro para el diagnóstico de la alergia alimentaria [5] [4].

La PEOC consiste en la administración del alimento en las condiciones lo más reproducibles posibles [63]. Puede ser abierta, ciego simple controlado con placebo o doble ciego controlado con placebo [64]. Se debe llegar a la dosis del alimento que el paciente comería en su dieta habitual y el escalado de dosis se realiza cada 15 minutos, ya que las reacciones agudas suelen ocurrir en este intervalo de tiempo [64].

Hay que tener en cuenta que es una prueba que hoy por hoy no está estandarizada y en ocasiones las PEOC con alimentos vegetales pueden ser negativas, o bien por la labilidad de algunos de sus alérgenos o por la dificultad de su enmascaramiento, o bien si hay cofactor asociado es difícil de reproducir. Además las PEOC tienen una sensibilidad del 70% al 100% y una especificidad del 40%-70% [65].

La DBPCFC es un método que no se emplea como un procedimiento de rutina, por las dificultades técnicas, costes, riesgos y por problemas éticos que comporta.

En España, según Alergológica [1], sólo se realiza PEOC para confirmar el diagnóstico en el 13% de las ocasiones y en la mayoría de los casos son de tipo abierto y no DBPCFC. Autores como Wood RA [9] o Ibáñez [8] valoran el poder llegar al diagnóstico sin necesidad de PEOC, es decir, en caso de reacción clara, inequívoca, frente a un alimento identificado o bien si el diagnóstico es claro tras realizar anamnesis, SPT y/o IgE específicas y/o dietas de eliminación frente al alimento. Todo esto hace plantearse si las guías están siendo demasiado restrictivas o demasiado exigentes, pudiendo llegarse al diagnóstico sin someter al paciente a riesgos evitables.

La interpretación adecuada de los resultados de las pruebas cutáneas requiere ser valorada en conjunto con la historia clínica. Una prueba cutánea, por sí sola, únicamente indica sensibilización a un alérgeno. Para que la prueba cutánea positiva a un alérgeno tenga valor diagnóstico, se debe demostrar que los síntomas del paciente son producidos por la exposición a ese alérgeno por historia clínica o por pruebas de exposición controlada. En caso de una

historia inequívoca, en pacientes que habían tenido reacciones sistémicas graves, así como aquellos con reacciones típicas, recientes y repetidas, con pruebas cutáneas positivas se considera de valor diagnóstico definitivo [8] [9].

1.5. Tratamiento

El principal tratamiento a día de hoy para la alergia alimentaria es la dieta de exclusión del alimento o alimentos implicados. En el caso de los pacientes con alergia a alimentos por LTP, esta dieta de exclusión puede ser especialmente complicada porque se han descrito proteínas de la familia de las LTP en prácticamente todos los alimentos de origen vegetal. Por eso es especialmente importante basar la dieta de exclusión en un correcto diagnóstico alergológico en el que la demostración de sensibilización al alimento debe estar acompañada de una historia clínica clara de hipersensibilidad al alimento o, en su defecto, de una prueba de exposición controlada. De lo contrario se podría incurrir en el error de indicar dietas innecesariamente restrictivas.

El tratamiento de la reacción aguda se basa en el uso de antihistamínicos en las reacciones más leves, con o sin corticoides, y adrenalina intramuscular en las reacciones anafilácticas.

En el año 2011 se comercializó una inmunoterapia sublingual con LTP (Pru p 3 (SLIT melocotón ALK-ABELLÓ) 50 µg Pru p 3/ml), pero hasta la fecha son pocos los estudios sobre su eficacia, y la experiencia clínica es escasa [66] [67]. Estaría indicada en pacientes con sensibilización a LTP y reacciones sistémicas con alimentos vegetales o bien en casos de aparición progresiva de nuevas sensibilizaciones con clínica [68] [69]. Recientemente se ha publicado un artículo con inmunoterapia SLIT con Pru p 3 con resultados prometedores para los pacientes con sensibilización a LTP. Se ha demostrado que tras un año de tratamiento con inmunoterapia sublingual con Pru p 3 se producen cambios inmunológicos y desensibilización, no únicamente para melocotón, sino también para otros alimentos que contienen LTP y que provocan reacciones graves tras su ingesta como el cacahuete [69].

En casos de alergias alimentarias múltiples con dietas muy restrictivas se ha publicado la utilización *“off label”* de omalizumab [70] [71] [72].

1.6 Alérgenos alimentarios

Los alérgenos alimentarios son antígenos, normalmente proteínas o glicoproteínas, que tienen la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos de la clase IgE.

Los alérgenos se clasifican en *mayoritarios* cuando la frecuencia de reconocimiento entre los pacientes sensibilizados a una fuente alérgica determinada es superior al 50%, y *minoritarios* cuando esta frecuencia es menor al 50%. Sin embargo, esta clasificación no refleja la contribución de un alérgeno a la capacidad total de unir IgE y es variable en función de la población y el área geográfica estudiada.

Muchas de las moléculas alérgicas han sido clonadas o purificadas por lo que existe un listado de alérgenos oficialmente aceptado, que es revisado y actualizado periódicamente por el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la IUIS (Unión Internacional de Sociedades de Inmunología). Dicho subcomité se dedica a la elaboración y el mantenimiento de su nomenclatura sistemática, así como a la actualización de una base de datos de dichas moléculas alérgicas. Proporcionan información sobre la estructura, características bioquímicas y relevancia clínica para cada alérgeno [73]. La base de datos "Allergome" (<http://www.allergome.org>) proporciona información sobre bioquímica, estructura, función, biología molecular, inmunoquímica, alergenidad, genética y epidemiología de las fuentes alérgicas, pero a diferencia de la anterior, no están oficialmente aceptados. En el momento actual comprende a más de 130 alérgenos alimentarios de origen vegetal. Para organizar la nomenclatura se ha acordado que los alérgenos se denominarán con el nombre latino de la familia, tomando las 3 primeras letras del género, la primera letra de la especie y un número árabe. Así por ejemplo Lac s 1 corresponde a *Lactuca sativa* y 1 es el primer alérgeno descrito de lechuga.

Las proteínas identificadas y caracterizadas como alérgenos vegetales pertenecen a un número limitado de familias: cupinas, prolaminas, familia Bet v1 y profilinas que agrupan a más del 65% de los alérgenos vegetales [74] [75] [76].

La similitud estructural y de identidad de secuencia entre alérgenos de diferentes familias de proteínas explica los fenómenos de reactividad cruzada [77] [78] entre alimentos de diferentes especies botánicas y entre pólenes y alimentos. Se conoce como reactividad cruzada al

fenómeno inmunológico por el cual un mismo anticuerpo IgE reconoce distintos antígenos con una elevada homología estructural o identidad de secuencia [79] [80]. (Véase punto 1.8).

1.7 Vías de sensibilización

Se han descrito dos tipos de alergia alimentaria basados en el patrón de presentación clínica según los alérgenos causales y según el mecanismo inmunopatológico [81], a los que recientemente se les ha añadido una tercera posible vía de sensibilización, la vía cutánea [15] [82;83].

1.7.1. Alergia alimentaria de clase I: debido a una sensibilización primaria por vía digestiva a alérgenos alimentarios. Dichos alérgenos se han llamado “verdaderos” o “completos” y típicamente son alérgenos con una estructura terciaria muy estable y resistentes al calor y a la digestión enzimática. Entre otros encontramos las familias de las proteínas de almacenamiento de semillas y las LTPs [84] [85] [86].

1.7.2. Alergia alimentaria de clase II: Se producen por una sensibilización primaria por vía inhalada a alérgenos de pólenes que secundariamente inducen síntomas de alergia a alimentos por fenómenos de reactividad cruzada, lo que se ha denominado síndrome pólenes-alimentos. Característicamente los alérgenos responsables de estos síndromes son proteínas lábiles que no resisten el calor o la digestión y presentan epítomos IgE conformacionales con elevada homología entre pólenes y alimentos. Han sido denominados también como “incompletos” ya que provocan síntomas en pacientes sensibilizados a pólenes, pero no son capaces de actuar como sensibilizantes primarios a través de la vía digestiva en pacientes no polínicos. Típicamente, la alergia alimentaria se presenta años después de los síntomas respiratorios [87].

1.7.3. Alergia alimentaria clase III: Recientemente se ha propuesto una tercera vía de sensibilización [15] [82] [83] para inducir una alergia alimentaria, la vía cutánea. Así los sujetos, principalmente niños con dermatitis atópica se sensibilizarían por contacto con cacahuete en pacientes con la barrera epitelial alterada.

1.8. Reactividad Cruzada

Se conoce como reactividad cruzada (RC) al fenómeno inmunológico por el cual un mismo anticuerpo IgE reconoce distintos antígenos con una elevada homología estructural o identidad de secuencia [79] [80]. En el caso de la alergia alimentaria, un mismo anticuerpo reconoce distintos antígenos alimentarios que muestran identidad parcial en su secuencia de aminoácidos ya que el anticuerpo reconoce solamente a un epítipo (nº limitado de aminoácidos) del antígeno. El fenómeno de RC incrementa el número de fuentes alérgicas frente a las que el individuo desarrolla reacciones alérgicas.

En el consenso de la OMS [88] para predecir la alergenidad de las proteínas, definen que para que exista reactividad cruzada (RC), una proteína reacciona de forma cruzada con un alérgeno si comparten al menos un 35% de similitud de secuencia del total de un fragmento de 80 aminoácidos o identidad completa con un péptido de 6-8 aminoácidos consecutivos tienen la posibilidad de inducir RC entre ellos. A pesar de que a nivel *in vitro* sería suficiente una similitud de secuencia de un 35% para explicar fenómenos de RC entre 2 proteínas, parece necesaria una similitud estructural superior al 70% para que haya traducción clínica [80].

Cuanto más próximas filogenéticamente más probabilidades hay que dos proteínas compartan homología estructural. Así la mayoría de RC se producen en especies filogenéticamente cercanas, es decir, lo más frecuente es que un paciente presente reacciones con un alimento y con alimentos de la misma familia (pe: melocotón y albaricoque), aunque en ocasiones la reactividad cruzada puede ocurrir con alimentos de familias taxonómicamente no relacionadas (proteínas homólogas) [80].

Por medio de técnicas de inhibición es posible determinar la reactividad cruzada entre dos fuentes alérgicas, pero para determinar cuáles son los alérgenos responsables de dicha RC se debe recurrir a técnicas de proteómica y biología molecular [79].

Para el clínico es de especial interés discernir si la sensibilidad al alimento es genuína o se ha producido por RC con la fuente polínica por lo que tendrá importancia en el manejo diagnóstico y terapéutico de los pacientes. [79] [89] [56].

En los últimos años ha aumentado el número de pacientes con polisensibilización tanto a pólenes como a alimentos vegetales. En la mayoría de ocasiones no tienen repercusión clínica,

es decir, se trataría de sensibilizaciones asintomáticas, por lo que es muy importante un correcto diagnóstico para no realizar dietas de exclusión restrictivas. En el caso de los pólenes podemos encontrarnos con pacientes sensibilizados a pólenes no existentes en su zona de residencia a los que no han podido estar expuestos [90]. En el estudio Vegetalia [21] realizado en España ya se pudo ver polisensibilización en pacientes con alergia a pólenes y alimentos y un perfil molecular diferente según la zona estudiada, datos que también se observaron en el estudio EXPO que estudiaba la frecuencia de sensibilización a pólenes en España objetivándose diferente perfil de sensibilización según el área de estudio [91].

1.9. Panalérgenos

Se define como panalérgenos a distintas familias de antígenos que reaccionan de forma cruzada entre especies taxonómicamente no relacionadas o lejanas [92]. Son proteínas altamente conservadas desde un punto de vista evolutivo, y altamente distribuidas en el reino vegetal que suelen estar implicadas en funciones biológicas importantes como puede ser defensa de las plantas (LTPs, taumatinas) o estructurales (profilinas).

Disponemos comercialmente de algunos panalérgenos para diagnóstico por componentes (LTPs, Taumatinas y profilinas). En la práctica clínica disponemos de profilina de Palmera (Pho d 2) y LTP de melocotón (Pru p 3) para realización de pruebas cutáneas, pero no de taumatina.

Los panalérgenos descritos hasta la fecha comprenden sólo a un pequeño número de familias de proteínas, incluyendo las profilinas, las LTPs y las taumatinas. Estos panalérgenos se han relacionado con fenómenos de RC entre vegetales, como es la lechuga, objeto de la presente tesis.

1.9.1 LTP (PR-14)

Las Proteínas de Transferencia de Lípidos (LTP) (Figura 2) son proteínas de defensa de las plantas superiores, que se producen en respuesta a agentes infecciosos (hongos y bacterias) y en situaciones de estrés abiótico: sequía, inundaciones, temperatura ambiental extremadamente baja, ozono, luz ultravioleta o agresiones mecánicas. Su función principal es la intervención en la homeostasis y en la adaptación de las plantas al entorno.

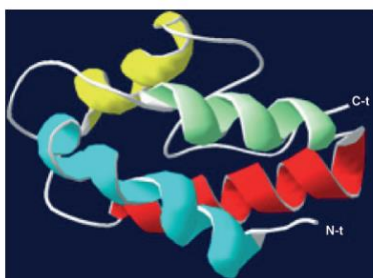


Figura 2. Estructura tridimensional de Pru p 3. Tomada de G. Salcedo, R. Sánchez-Monge, A. Díaz-Perales, G. García-Casado and D. Barber. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. Clin Exp Allergy 2004; 34:1336–41 [93]

INTRODUCCIÓN

Se incluyen en el grupo PR-14 de proteínas de defensa y comparten todas ellas varias propiedades químicas comunes como son su bajo peso molecular (9-10kDa), ser proteínas básicas, estabilidad a pH bajo, y la resistencia a las proteasas [94], lo que las convierte en alérgenos alimentarios “ideales” capaces de resistir el pH gástrico y la digestión peptídica [95]. Todas estas características hacen que se hayan propuesto como modelo de alérgeno alimentario ya que posibilita que actúen como agentes de sensibilización primaria por ingestión y además se asocian a síntomas clínicos sistémicos y graves [96] [97]. Al ser resistentes a los tratamientos térmicos se pueden volver a plegar tras el enfriamiento, lo que hace que también se puedan encontrar en alimentos procesados como zumos o mermeladas [98] [99] [100], vinos [43] [44] o cerveza [101].

Se encuentran en mayor cantidad en las capas externas de las plantas, con una concentración hasta siete veces mayor en piel. En un estudio realizado en España por Carnés y col [102] se describió que el 25% de las proteínas de la piel de melocotón es LTP, mientras que en la pulpa es del 7%, lo que puede justificar que algunos pacientes toleren los alimentos pelados. Las rosáceas, y sobretodo el melocotón (prototipo de alimento de este grupo), las presentan concentradas en su piel y especialmente en la pelusa [103].

Las LTPs se dividen en dos tipos: LTPs específicas para ciertas clases de fosfolípidos y LTPs no específicas (ns-LTPs) capaces de transportar diversas clases de lípidos: se han descrito como alérgenos en frutas, verduras, frutos secos, polen y látex y son las mayoritarias (ver Tabla 1). La identidad de secuencia entre las ns-LTPs varía entre un 30 y un 95% [95].

LTPs alérgicas (IUIS)							
Alimentos					Pólenes		Látex
Frutas		Vegetales	Frutos secos	Legumbres	Malezas	Árboles	
Act c 10	Pru ar 3	Api g 2	Ara h 9	Len c 3	Amb a 6	Ole e 7	Hev b 12
Act d 10	Pru av 3	Aspa o 1	Cas s 8	Pha v 3	Art v 3	Pla a 3	
Cas s 8	Pru d 3	Bra o 3	Cor a 8		Hel a 3		
Cit l 3	Pru du 3	Lac s 1	Jug r 3		Par j 1		
Cit s 3	Pru p 3	Lyc e 3			Par j 2		
Fra a 3	Pyt c 3	Zea m 14			Par o 1		
Mal d 3	Vit v 1						

Tabla1. LTPs alérgicas adaptada de Egger [95]

INTRODUCCIÓN

Asero [86] [104] demostró la RC in vitro entre alérgenos vegetales taxonómicamente no relacionados, concluyendo que las LTP eran panalérgenos con alta reactividad cruzada. Díaz-Perales confirmó que la RC no era sólo con otras frutas no relacionadas, sino también con pólenes y frutos secos. Presentan una alta RC entre ellas debido a su similitud estructural [105] [106] [107], demostrada tanto in vivo [108] como in vitro [109], excepciones serían Pru p 1 y 2 de parietaria y Ole e 7 de olivo [110]. La gran evidencia clínica acumulada hasta la actualidad ha permitido definir a las LTP como una familia de panalérgenos relevantes tanto en alimentos vegetales como en pólenes. [75] [111] [93].

Las LTPs están consideradas como la familia de alérgenos más relevantes en el área Mediterránea. Se han descrito principalmente en Sur de Europa [97], y suelen dar reacciones de tipo sistémico [112], aunque también reacciones más leves tipo SAO [97] o incluso presentar sensibilizaciones asintomáticas [113]. Se ha descrito que el patrón clínico de reacción grave por sensibilización a LTPs es frecuente cuando no hay sensibilización concomitante a pólenes [29] [21] [114] [84].

Dado que en ocasiones, aproximadamente en el 20%, no se encuentra polinosis asociada a las LTPs, se ha postulado que la sensibilización ocurriría por vía oral [84] [115] [19] [116] [117].

La presentación de síntomas sistémicos y graves [116] [47], y la presencia en muchos casos de un cofactor implicado [24] [23] [41], hace que en los últimos años se haya profundizado en su estudio y diversas publicaciones hayan intentado dilucidar cuál sería la vía de sensibilización a LTPs, postulándose tanto la vía digestiva, la vía inhalada [118] [119] [107] [120] [121] o cutánea [15] [82] [83]. Se ha comprobado que los pacientes pueden además presentar múltiples sensibilizaciones a diferentes LTPs, denominándose entonces síndrome de LTP [111], lo cual complica su manejo.

La LTP más importante en nuestra zona es la LTP de melocotón Pru p 3, que parece ser el “iniciador” de la sensibilización al resto de LTPs tanto de alimentos como de pólenes.

1.9.2. Taumatinas (PR-5)

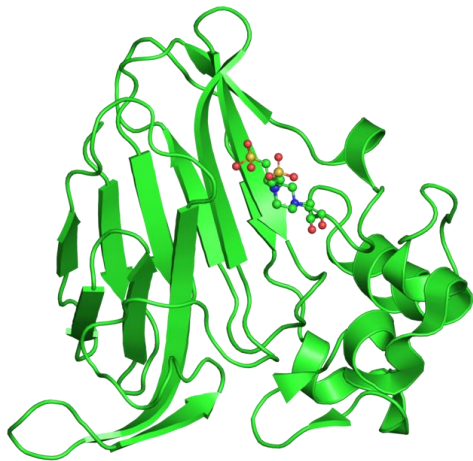


Figura 3. Taumatina de kiwi. Tomada del Protein Data Bank con referencia 4BCT.

Las taumatinas (TLP: Thaumatococcus-like proteins) son panalérgenos que pertenecen al grupo 5 de proteínas de defensa vegetal (PR-5), tienen pesos moleculares de 20–30 kDa (habitualmente sobre 24 kDa), con una estructura tridimensional muy estable, que es mantenida por ocho puentes disulfuro (Figura 3). Son generalmente resistentes a la degradación proteolítica [122] (gástrica e intestinal), al pH (estables a pH bajo) o a la desnaturalización inducida por el calor. Se inducen durante la maduración y se han descrito como proteínas de defensa de las plantas contra el ataque de patógenos, especialmente frente a hongos.

Estas características físico-químicas hacen que se comporten de manera semejante a las LTPs, y la clínica más habitualmente descrita son las reacciones sistémicas [123].

Las taumatinas han sido descritas en frutas, frutos secos, pólenes y cereales, considerada por tanto como panalérgeno. La primera taumatina alergénica descrita fue la de manzana (Mal d 2) [124] siendo una de las proteínas mayoritarias en la manzana madura y su distribución es igual en pulpa que en piel [125]. Posteriormente se han descrito en melocotón (Pru p 2) [126], manzana (Mal d 2) [127] [124] [122] [128], cereza (Pru a 2) [129], pimienta [130], kiwi [131]

INTRODUCCIÓN

[132] [133], uva [44], plátano [134], Trigo [135], piel de melón [136] y en pólenes como el de ciprés [137], olivo [138] y platanero [123]. También en los últimos años descritas en avellana, níspero, marihuana, castaña (tabla 2).

Taumatinas alergénicas (IUIS) y Allergome							
Alimentos						Pólenes	
Frutas			Vegetales	Frutos secos	Cereales	Árboles	
Mal d 2 manzana	Mus a 4 plátano	Cuc m TLP melón	Sola l TLP tomate	Cor a TLP Avellana	Tri a TLP trigo	Cup a 3 Cupressus arizónica	Cry j criptomera japónica
Act d 2 kiwi	Pru av 2 cereza	Vit v TLP uva	Lac s TLP lechuga	Pru d 2 almendra		Cup s 3 Cupressus Semperviven	Ole e 13
Pru p 2 melocotón	Cap a 1 pimiento		Can s TLP marihuana	Cas s TLP castaña		Jun a 3 Juniperus	Pla TLP
Cis s TLP naranja	Man Za TLP níspero		Bra 0 TLP Coliflor			Jun v 3 Juniperus	Art v TLP
							Bet v TLP Abedul

Tabla2. Taumatinas alergénicas. En color verde los aceptados por IUIS, en naranja Allergome

La mayoría de datos de los que se dispone en la actualidad sobre su alergenicidad vienen de ensayos “*in vitro*” con estas proteínas. Aunque existen pocos datos de RC entre taumatinas [139] [133] [140] [123], los existentes indican que podrían ser responsables de la reactividad cruzada entre alimentos y pólenes [141]. La prevalencia de sensibilización descrita a las taumatinas es muy variable, dependiendo del método usado para su identificación [126], siendo de entre el 30-90% [123].

En estudio de Fernandez-Rivas [128] con manzana que se realizó a nivel europeo, se objetivó que España es la que más sensibilización a taumatina presenta entre toda la población europea, confirmandose así que en España su frecuencia de sensibilización lo hace ser un alérgeno principal.

En un estudio multicéntrico realizado en España [123] para establecer el papel de la taumatina en la reactividad cruzada entre frutas y pólenes, se utilizaron 16 taumatinas purificadas de distintas fuentes. Se compararon dos grupos, uno con alergia a alimentos y otro con alergia a

INTRODUCCIÓN

pólenes observándose que existía un mayor reconocimiento de taumatinas en los pacientes que tenían alergia alimentaria y polinosis asociada.

Las taumatinas de melocotón, castaña, lechuga, col y polen de plátano de sombra fueron las más frecuentemente reconocidas con frecuencias de reconocimiento mayor del 10%. La taumatina de melocotón, Pru p 2, fue la que presentó mayor porcentaje de respuestas positivas y según las zonas estudiadas llegando hasta un 50% de reconocimiento en áreas como Barcelona, Bilbao, Canarias y Madrid. Se observó además en este estudio un patrón de asociación entre Pru p 3 y Art v 3 y la taumatina de melocotón Pru p 2.

Por el aumento de su prevalencia se postula que deberían ser incluidos en estudios de rutina en alergia a frutas en el área Mediterránea [123].

La TLP de melocotón parece ser el iniciador/marcador de la sensibilización a Taumatinas, igual que ocurriría en las LTPs con el melocotón, al menos en la zona estudiada [123].

El diagnóstico de sensibilización a taumatinas actualmente está muy limitado, ya que no se dispone de ninguna taumatina purificada en extracto para SPT y para la detección de IgE específica a taumatina disponemos de la Act d 2 de kiwi en ISAC, pero no en InmunoCAP. Este hecho supone un gran reto en el momento actual ya que es un problema emergente y según los diversos estudios realizados cada vez más pacientes presentan síntomas en los que las taumatinas estarían implicadas.

1.9.3. Profilinas

Las profilinas son proteínas citosólicas pequeñas, de 12-15 kDa, presentes en todas las células eucarióticas. Regulan la polimerización de filamentos de actina, necesaria para el crecimiento de raíces, tallos y elongación celular [142] [143]. En la figura 4 se muestra la estructura de las profilinas.

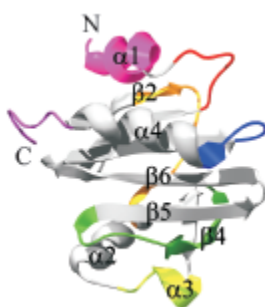


Figura 4. Estructura de las profilinas. Tomada de C.Radauer, M. Willeroider, H. Fuchs, K. Hoffmann-Sommergruber, J. Thalhamer, F. Ferreira, O. Scheiner and H. Breiteneder. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. Clin Exp Allergy, 36, 920-929 [142].

Las profilinas de especies vegetales constituyen una familia de proteínas altamente conservadas, con identidades de secuencia de alrededor del 80%, incluso entre miembros de organismos muy distantes filogenéticamente

[142]. Identificadas como alérgeno en 1991 por Valenta [144], se han descrito en pólenes, látex y alimentos de origen vegetal. La sensibilización a estos alérgenos se ha considerado un marcador predictivo de reacciones alérgicas a múltiples fuentes de pólenes y de alergia a polen asociada a alimentos [145] [146].

La prevalencia de sensibilización a profilinas varía en función del área geográfica y el tipo de perfil alérgico. En pacientes polínicos es de alrededor de un 20% en el centro de Europa, aunque con cifras muy inferiores en el norte [147], mientras que la prevalencia de sensibilización a profilinas alcanza el 70 % en pacientes alérgicos a pólenes y alimentos. En pacientes alérgicos a tomate o cucurbitáceas se comportaría como alérgeno mayor [21].

Son sensibles al calor y a la digestión gástrica, y por ello los síntomas que provocan se suelen localizar a nivel de cavidad oral (síndrome de alergia oral) [148] [149]. Sin embargo, en zonas con alta carga de exposición a polen de gramíneas, donde la prevalencia de sensibilización a profilinas supera el 50%, se han descrito reacciones sistémicas [150].

1.10. Síndromes pólenes-alimentos vegetales

La alergia a alimentos relacionada con polinosis es la forma más frecuente de alergia a alimentos entre los adolescentes y adultos europeos [151] [13] [18], y es el resultado de la RC entre proteínas homólogas de pólenes y alimentos vegetales [152].

Estudios realizados en los últimos años concluyen que entre el 30-60% de los pacientes polínicos europeos sufren alergia alimentaria a vegetales [29] [153] [154]. Más del 75% de los pacientes alérgicos a frutas lo son también a pólenes, que varían según la zona geográfica, por lo que se han descrito diversas asociaciones pólenes-alimentos [29] [155]. En la tabla 3 se resumen los principales síndromes pólenes-alimentos descritos y los alérgenos implicados.

Síndromes de alergia al polen y alimentos		
Polen	Alimento	Alérgenos
Abedul	Rosáceas Apiáceas Avellana	Homólogos de Bet v1 Profilinas
Abedul Artemisia	Apiáceas	Homólogos Bet v1 Profilina CCD
Artemisia	Compuestas Rosáceas Brasicáceas	LTP Profilinas

INTRODUCCIÓN

	Frutos secos	
Gramíneas Polisensibilizados	Rosáceas	Profilinas CCD
Plátano de sombra	Avellana, cacahuete, plátano, manzana, lechuga, garbanzo, apio, maíz	Profilinas LTP
Plantago Gramíneas	Curcubitáceas	Profilinas Alérgenos de 31 kDa Alérgenos de 40-70 kDa

Tabla 3. Tabla resumen de los síndromes pólenes-alimentos. Adaptada de Tratado de Alergología, 2ª Edición, Tomo III, página 1053.

1.10.1. Síndromes polen-alimentos por sensibilización a LTP.

En cuanto a las LTPs, lo primero que llama la atención es la distribución geográfica tan característica, principalmente en el área Mediterránea. Dicho patrón ha puesto el foco en esta zona y muchos son los estudios que han intentado arrojar luz en este tema en los últimos años.

Se ha hablado mucho sobre la implicación de un factor ambiental en la sensibilización a LTPs, aunque la sensibilización a LTPs se cree que es primariamente por vía oral. Algunos estudios consideran el papel potenciador de la sensibilización a pólenes que afectan principalmente al área Mediterránea y que contienen alérgenos homólogos a LTP [156] [109].

En nuestro país, el polen de gramíneas es el principal causante de rinitis y asma, pero si el paciente presenta asociada una alergia alimentaria los principales causantes suelen ser el polen de platanero o el de artemisia, y debido principalmente a LTP.

1.10.1. Polen de Artemisia

Se ha asociado la alergia al polen de artemisia con alergia a alimentos de la familia de las compuestas (lechuga y pipa de girasol), frutos secos, rosáceas, tomate y brasicáceas [22] [157]. La clínica presentada por los pacientes varía desde SAO a anafilaxia y la sensibilización a artemisia suele ser subclínica, por lo que la fuente de sensibilización parece ser los alimentos, probablemente debido a LTP [109] [107] [97] [114] [158] [159]. La LTP de artemisia Art v 3 muestra cerca del 50% de homología con Pru p 3, así como reactividad cruzada [159] [114]. Los pacientes que reconocen Pru p 3 y Art v3 reconocen un amplio rango de alimentos vegetales. Se ha demostrado una RC parcial entre la LTP del polen de artemisa y las LTP de lechuga, melocotón, manzana y castaña [160] [161] [108].

1.10.2. Polen de Platanero

El polen de platanero es un alérgeno inhalante importante en el Sur de Europa [162] [163]. La sensibilización a platanero se ha asociado frecuentemente con alergia alimentaria [162] [164] [165] [166] [21] [23], definiéndose el Síndrome Platanero-vegetales.

Dos grupos españoles [162] [164], previo al conocimiento de la LTP de platanero, publican la existencia de RC entre polen de platanero y alimentos de origen vegetal, entre ellos la lechuga. Posteriormente Lauer y col [106] purifican la LTP de polen de platanero, Pla a 3, y observan que Pla a 3 se comporta como alérgeno mayoritario en los casos de pacientes con alergia al polen de platanero y alergia al melocotón. En algunos pacientes existía positividad a Pla a 3 con Pru p 3 negativo, indicando que quizás Pla a 3 podría comportarse como sensibilizante primario en algunos casos. El polen de platanero presenta una alta identidad de secuencia con Pru p 3, dicha alta homología explica la RC entre polen de plátano de sombra y algunos alimentos de origen vegetal [162] [164]. En los estudios de San Miguel [160] y Hartz [167] mostraban RC entre Pla a 3 y LTP de lechuga. También RC entre Pla a 3 y melocotón [106], lo que implicaría rol importante de las LTPs en este síndrome platanero-alimentos.

Cuesta-Herranz [21] en estudio Vegetalia, constató que la sensibilización a platanero se convierte en la segunda sensibilización en importancia en los pacientes con alergia a pólenes y alimentos en la población estudiada. En el año 2012 Pascal y col [23] evaluó la sensibilización concomitante a pólenes en pacientes con síndrome LTP, siendo la de plátano de sombra la más importante (93%) y la sensibilización a artemisia la segunda en frecuencia (73%).

1.11.- Síndrome LTP

Mientras algunos pacientes sensibilizados a LTP son alérgicos a un único alimento vegetal, otros tienden a desarrollar sensibilización o alergia a una gran variedad de alimentos vegetales y pólenes no relacionados taxonómicamente. Esto último se ha denominado síndrome de LTP [111] y es consecuencia del alto grado de RC entre las diferentes LTPs, incluyendo aquellas distantes taxonómicamente [104] [23] [110]. La abundancia de LTPs presentes en frutas, vegetales, frutos secos y látex hace que pueden jugar un papel importante por la amplia gama de alimentos implicados en las reacciones [23] [168] [114].

Entre las peculiaridades únicas de este síndrome destacan su distribución geográfica limitada al área mediterránea, la implicación frecuente de cofactores en las reacciones y su menor

INTRODUCCIÓN

gravedad cuando coexiste alergia a pólenes [29] [21] [114]. También es cierto que los pacientes con Síndrome LTP muestran un complejo patrón clínico [113] y múltiples sensibilizaciones a vegetales y pólenes que dificultan su manejo [169] [21].

Las LTPs pueden sensibilizar por vía digestiva [156], postulándose que la sensibilización a LTP de melocotón puede ser debida al gran consumo de este alimento en el área Mediterránea, aunque, cómo se ha comentado en el punto anterior (1.10), posible papel de la sensibilización inhalatoria a LTPs de pólenes como factor de riesgo en sensibilización alimentaria múltiple. También se ha postulado como tercera vía de sensibilización la vía cutánea. Todavía no hay estudios concluyentes que confirmen cual es la vía de sensibilización a LTPs.

En el momento actual poco se sabe sobre el papel que desempeñan otras LTPs diferentes a Pru p 3 en el desarrollo de este síndrome, parece que Pru p 3 precede a la sensibilización a otras LTPs y que existirían diferentes patrones de reactividad cruzada entre LTPs.

En estudio Palacin [170] en el que se analizaba por microarray la sensibilización a LTPs en diferentes zonas de España, se observó diferencias significativas en cuanto al reconocimiento. Las zonas donde había más pacientes que reconocían LTPs (Barcelona y Canarias) eran también las zonas donde la polinosis de platanero y artemisia tienen una mayor presión polínica. Se ha comprobado que Ole e 7 de olivo y Par j 1 y 2 de parietaria no formarían parte en la actualidad del síndrome LTP (Ole e 7 y Par j 1 y 2 baja identidad de secuencia con Pru p 3 (Ole e 7 <20%) y (Par j 1 y 2 entre el 27-29%)).

En un estudio reciente realizado en Barcelona [23], para la caracterización clínica de este síndrome, en una muestra de pacientes alérgicos a LTP, arrojó datos sobre los vegetales más frecuentemente relacionados que incluyeron frutas rosáceas y no rosáceas y vegetales; los alimentos más frecuentemente reportados por los pacientes y confirmados por SPT, fueron melocotón (75.6%), seguido de lechuga (48.9%), nuez (46.7%) y avellana (33.3%) [23].

La clínica puede variar desde pacientes sensibilizados a varias LTPs y que son asintomáticos hasta pacientes que presentan reacciones sistémicas con diversos alimentos que contienen LTPs [168] [156]. Se desconoce en el momento actual el porqué de esta gran variabilidad

INTRODUCCIÓN

clínica, aunque algunos autores han postulado que podría ser debido a los niveles de IgE específicas a LTP [169] [171] [172] [173] [174] [114].

En pacientes con alergia a LTPs la existencia de cofactores es un dato de importancia capital en aquellos que presentan reacciones de severidad. En el estudio de Pascal [23] en el 40% de los pacientes había un cofactor implicado, en el de Cardona [24] se confirmaba la amplificación de reacción en presencia de cofactor ya que la anafilaxia era la presentación más frecuente y más del 90% de los individuos estaban sensibilizados a LTP; y en el de Romano [41], se concluía que en la población estudiada el 78% de los pacientes estaban sensibilizados a LTPs.

La lechuga es uno de los alimentos vegetales más frecuentemente relacionados con el Síndrome LTP, pero poco se conoce acerca de sus particularidades, siendo pocos las series de casos reportados hasta la fecha [167] [160] [24] [23].

1.12. Alergia a la lechuga

1.12.1 Lechuga. Familia botánica

La lechuga (*Lactuca sativa*) es un alimento vegetal que pertenece al reino *Plantae*, división magnoliophyta, clase magnoliopsida, orden asterales, familia *Asteraceae* (Compositae), subfamilia *Cichorioideae*, tribu *Lactuceae*, género *Lactuca* y especie *sativa*.

Pertenece a la familia de las compuestas y es uno de los vegetales más consumidos en España y en toda el área Mediterránea. Dentro de las *Asteraceae* se encuentran muchos tipos de hortalizas de diversas especies: de hoja (achicoria, lechuga, endibia, escarola), de flor (alcachofa, girasol) o de tallo (cardo) y pólenes (artemisia, ambrosía, taraxacum). Esta familia, cuyo nombre actual deriva del griego Aster (estrella), se caracteriza por que sus flores están compuestas por la fusión de cientos e incluso miles de flores diminutas.

1.12.2 Variedades y consumo

Se cree que su origen es en la zona mediterránea, y se dispone de datos de su consumo en Persia en el año 400 a.C.

Es un componente habitual en la dieta de muchos países, y es uno de los vegetales más consumidos en España y base de la dieta mediterránea.

En función de su morfología podemos distinguir cuatro variedades: (tabla 4).

Tabla 4. Variedades de lechuga.

<p><u>Romana:</u> <i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i> (Romana, Baby, Tipo “Cos”). Es una variedad con tronco ancho, alargado y erguido. Sus hojas son de color verde oscuro y se agrupan de forma poco apretada alrededor de un tronco, sin formar un verdadero cogollo.</p>	
<p><u>Acogollada:</u> <i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> (Batavia, Trocadero, Iceberg) variedades que forman un cogollo apretado. Destacan los cogollos de Tudela, variedad muy cultivada en toda la ribera del río Ebro.</p>	
<p><u>De hojas sueltas:</u> <i>L. sativa</i> var. <i>inybacea</i> (Lollo Rosso, Red salad Bowl, Cracarelle) presentan hojas sueltas y dispersas.</p>	
<p><u>Lechuga espárrago:</u> <i>L. sativa</i> var. <i>augustana</i>. Cultivadas principalmente en China e India.</p>	

1.12.3 Epidemiología de la alergia a la lechuga:

Pese a su amplio consumo a nivel mundial y mayoritariamente en la zona mediterránea hay poco datos publicados sobre alergia a la lechuga. Se trata básicamente de series de pocos casos o incluso de casos clínicos aislados [175] [176] [177] [178] [179] [160] [167] [180].

Los primeros casos descritos de alergia a lechuga fueron casos de dermatitis de contacto [181] [182] [183] [184] [185] [186] [187] [188], principalmente profesional por manipulación de lechuga en pacientes que trabajaban en invernaderos, como jardineros o cocineros [189] [186] [190] [191]. Oliweki [189] describió empeoramiento de dermatitis por compuestas en un paciente que presentó además angioedema labial y facial tras la ingesta de lechuga. Gottschalk [192] reportó una erupción cutánea en un paciente joven que trabajaba envasando vegetales con pruebas cutáneas positivas a lechuga. Recientemente Paulsen [193] [194] ha publicado una amplia revisión sobre dermatitis de contacto con lechuga, confirmando que la lechuga puede ser causante de reacciones alérgicas sistémicas de contacto aparte de dermatitis de contacto. Además de casos de dermatitis de contacto se ha descrito alergia mediada por IgE, cuya clínica y alérgenos responsables se enumeran a continuación.

1.12.4 Alérgenos de lechuga

En el año 1994 se describió el primer caso de anafilaxia tras la ingesta de lechuga [175]. En el extracto de lechuga se detectaron 14 bandas proteicas con pesos moleculares aproximados de entre 13 y más de 113 kDa. No fue hasta el año 1998 cuando Vila y colaboradores [178] describieron un caso de anafilaxia tras ingesta de lechuga, en el que describieron cuatro bandas proteicas fijadoras de IgE de 50, 43, 39 y 16 kDa, de las cuales, sólo la de 16 kDa concluyeron que podría corresponder a una profilina. Con posterioridad este resultado no se ha reproducido y hasta la fecha no se ha caracterizado ninguna profilina como alérgeno de lechuga. Las otras tres bandas fijadoras de IgE que fueron encontradas en el extracto de lechuga, con pesos moleculares alrededor de 50, 43, y 39 kDa, tampoco se identificaron.

Con posterioridad se han ido describiendo otras bandas fijadoras de IgE en el extracto de lechuga, como una banda de 42–48 kDa descrita por tres grupos independientes [176] [177] [195] y que se propuso como la responsable de la RC entre lechuga, endivia y achicoria.

Olivé-Perez [179] describió un caso de anafilaxia tras la ingesta de cogollos de Tudela, reconociendo bandas fijadoras de IgE entre PM de 15 y 65 kDa en el inmunoblot. Llama la atención que los autores no repararan en que en ese mismo ensayo se observaba una banda fijadora de IgE de unos 9 kD, que probablemente podría corresponder con una LTP.

INTRODUCCIÓN

No es hasta el año 2003 en el que San Miguel y col [160] identifican y caracterizan la LTP de lechuga, una proteína de 9kD que fue denominada como Lac s 1 y que fue reconocida por el 71.43% de los pacientes de dicho estudio. Posteriormente Hartz [167] y col demostraron la implicación de Lac s 1 en episodios de anafilaxia tras la ingesta de lechuga y describían que la unión de IgE a la proteína de 24 kDa y a las proteínas de más de 50 kDa se debía la RC con determinantes de carbohidratos (CCDs). Este mismo grupo comprobó que no había diferencias entre los perfiles proteicos de diferentes variedades de lechuga ni tampoco entre las hojas internas o más externas del vegetal, aunque no podía excluir que a nivel de las hojas los niveles de LTP fueran mayores que en el tallo, a diferencia de Frank [176] y Cadot [195] que sí observaron más alérgenos en tallo. Nuestro grupo estudió la RC entre varias variedades de lechuga no encontrándose diferencias significativas entre las variedades testadas (Romana, Batavia, Maravilla, Trocadero, hoja de roble, Iceberg) [196].

En cuanto a la reactividad cruzada de lechuga se ha descrito que la LTP de lechuga, Lac s 1, presenta RC con otras LTPs tanto de alimentos (frutos secos, Rosáceas) como de pólenes (artemisia, platanero) [197]. Presenta gran identidad de secuencia con la LTP de melocotón, Pru p 3 (66%) y con la LTP de platanero, Pla a 3 (72%) [160]. Se ha demostrado también la reactividad cruzada entre Lac s 1 y Pru p 3 por medio de ensayos de inhibición [180].

Así mismo, se ha descrito reactividad cruzada entre miembros de la familia de las compuestas. Cadot [195] describió el caso de un paciente alérgico a achicoria que presentó también reacciones alérgicas con endivias (*Cichorium endivia*) y lechuga (*Lactuca sativa*) relacionadas botánicamente, pero no encontró reactividad cruzada con el polen de artemisia, un miembro de la misma familia.

García Ortiz [157] demostró que los sujetos alérgicos a artemisia presentaban un riesgo mayor de sensibilización concomitante a varios alimentos incluyendo la lechuga, llegando a la conclusión que podía ser responsable un alérgeno común.

En los estudios realizados en dermatitis de contacto por compuestas se observa que pueden reaccionar de forma cruzada con la endivia, y con varios miembros de las compuestas.

1.12.5 Clínica

En cuanto a los síntomas presentados por los pacientes con alergia a lechuga se han descrito síntomas leves como SAO [178] [160] [167] [162] [198], urticaria y angioedema [167] y otros como síntomas gastrointestinales [23] [160] [167], aunque la mayoría de las reacciones

INTRODUCCIÓN

descritas por alergia a lechuga son reacciones sistémicas (principalmente anafilaxias) [160] [167] [199].

A pesar de los pocos artículos publicados, en los últimos años se ha publicado como causa importante de alergia alimentaria entre los pacientes que padecen alergia a alimentos mediada por cofactor (CEFA) [24] y en el Síndrome de LTP [23].

En estudios realizados hasta el momento se observa que otras proteínas diferentes de LTP pueden tener implicaciones importantes en las reacciones que presentan los pacientes alérgicos a lechuga.



2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La lechuga ha sido clásicamente considerada como un alimento con escasa capacidad para inducir reacciones de hipersensibilidad, sin embargo recientes publicaciones apuntan que su implicación en las reacciones alérgicas por alimentos sería mayor de lo que se creía inicialmente, y en la mayoría de los casos se asocia a alergia a otros alimentos vegetales.

La reactividad cruzada entre lechuga y otros alimentos se explicaría por la reactividad cruzada de Lac s 1, hasta la fecha el único alérgeno caracterizado de lechuga, con el resto de LTPs, pero es probable que haya otros alérgenos implicados en los fenómenos de reactividad cruzada que todavía no se han descrito.

2.2. OBJETIVOS

Se han planteado los siguientes objetivos:

- 1) Definir las características clínicas de los pacientes alérgicos a lechuga.
- 2) Determinar si la lechuga está relacionada con síndromes de reactividad cruzada.
- 3) Identificar y caracterizar nuevos alérgenos de lechuga.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección de pacientes

Los sujetos fueron seleccionados entre los pacientes que consultaban por síntomas compatibles con alergia alimentaria tras la ingesta de lechuga durante el período comprendido entre los años 2010 y 2011 en las consultas externas de Alergia de los Servicios de Alergia del Hospital Universitario de Vall d'Hebron (Barcelona) y Fundación Jiménez Díaz (Madrid).

El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Vall d'Hebron según las normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95) y el Real Decreto 223/2004, con nº de registro PR (AG)193/2011 (**Anexo 1**)

Criterios de inclusión:

- Haber presentado una historia clara de reacción adversa sugestiva de alergia mediada por IgE tras la ingesta de lechuga, demostración de IgE específica a extracto de lechuga por prueba cutánea o IgE específica sérica y/o prueba de exposición oral a lechuga, de acuerdo con el algoritmo descrito por Ibañez et al [8].
- Edad mayor de 16 años.
- Haber firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Estar embarazada o en periodo de lactancia.
- Padecer una enfermedad cutánea extensa, o una enfermedad infecciosa crónica de base.
- Padecer desórdenes psicológicos graves.

3.2.- Extracción sanguínea y conservación de muestras

La extracción de sangre se realizó por venopunción, utilizando tubos Vacutainer SST® (BD S.A, Madrid, España) con gelosa. A cada paciente se le extrajeron 2 tubos de 5 ml. Tras la extracción, se dejaba coagular la sangre a temperatura ambiente (TA) durante una hora y posteriormente se centrifugaba a 2000 g durante 10 minutos. Tras su centrifugado, el suero se almacenó en alícuotas de 1ml en la seroteca del Servicio de Alergología y se congeló a - 20°C para los posteriores ensayos *in vitro*. Para garantizar el anonimato de los pacientes las muestras fueron identificadas mediante siglas y números.

3.3. Cuestionario clínico-epidemiológico.

Se preparó un cuestionario que se realizó a cada paciente incluido en el estudio. Tras recoger los datos de filiación de los pacientes, se les realizaba una anamnesis extensa recogiendo las siguientes variables:

- Historia familiar de atopia
- Presencia de al menos uno de los siguientes síntomas presentados de forma inmediata (menos de una hora) tras la ingesta de lechuga: urticaria, angioedema, rinoconjuntivitis, dificultad respiratoria y/o sibilancias, prurito faríngeo o velopalatino, cambio de voz, disfagia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, mareo o pérdida de conciencia.
- Sensibilización sintomática con otros alimentos vegetales.
- Sensibilización sintomática con pólenes .

El Síndrome de LTP se consideró cuando los pacientes estaban sensibilizados a Pru p 3 (LTP de melocotón) y tenían síntomas con más de 2 alimentos vegetales no relacionados taxonómicamente.

- Implicación de cofactor en la reacción alérgica con lechuga: toma de AINEs, alcohol o realización de ejercicio físico en las horas previas o posteriores a la reacción con lechuga.
- Para garantizar el anonimato de los pacientes los cuestionarios fueron identificadas mediante siglas y números, que coincidía con el número de suero, de cada paciente incluido en el estudio (**Anexo 2**).

3.4 Pruebas cutáneas (SPT y SPPT)

Se practicaron pruebas cutáneas intraepidérmicas (SPT) según las recomendaciones de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (European Academy of Allergy and Clinical Immunology, EAACI) [45].

Para llevar a cabo esta prueba, el paciente debía suspender la toma de antihistamínicos, como mínimo, en los tres días anteriores a su realización.

Los pacientes fueron sometidos a SPT con la batería estándar de neumoaérgenos más habituales en nuestro medio (tabla 5).

Respecto a las pruebas intraepidérmicas con alimentos, la batería utilizada se muestra en la tabla 6 e incluía, además de un panel de diferentes extractos comercializados de alimentos vegetales, lechuga *Romana* (LETI Laboratorios, S.L., Barcelona, Spain), extracto de LTP purificada (Bial Aristegui) y extracto de melocotón (ALK-Abello Laboratories, Madrid, Spain).

MATERIAL Y MÉTODOS

Polen	Marca comercial	concentración
Bétula	Bial	30.000 DBU/ml
Cupressus sempervivens	Bial	10.000 DPU/ml
Olea europea	Leti	30HEP/ml.
Platanus	Leti	30 HEP/ml.
Gramíneas	Leti	30HEP/ml.
Parietaria	Leti	30HEP/ml.
Artemisia	Leti	30HEP/ml.
Plantago	Leti	30HEP/ml.
Chenopodium	Leti	30HEP/ml.
Cynodon	Leti	30HEP/ml.
Phragmites	Leti	30HEP/ml.
Profilina	Leti	50 µg/ml
LTP	Bial	0.1 mg/ml.
Control negativo	Leti	NaCl al 0.9%
Histamina	Bial	10 mg/ml

Tabla 5. Pruebas cutáneas con batería de pólenes habituales.

Para la realización de pruebas cutáneas con alimentos frescos, se utilizó el método del prick-prick (SPPT) que consiste en pinchar con la misma lanceta primero el alimento e inmediatamente después la piel del paciente [45]. Se realizó este procedimiento con las hojas frescas de lechuga romana por ser la variedad más consumida en nuestra zona y su elevada reactividad cruzada demostrada previamente por prueba cutánea por nuestro grupo [196].

MATERIAL Y MÉTODOS

Polen	Marca comercial	concentración
Almendra	Leti	7000 µg prot/ml
Avellana	Leti	3400 µg prot/ml
Cacahuete	Bial	5 mg/ml
Nuez	Bial	5 mg/ml
Piñon	Leti	3500 µg prot/ml
Pistacho	Bial	5 mg/ml
Castaña	Leti	10 mg/ml
Pipa de girasol	Bial	5 mg/ml
Melón	Leti	275 µg prot/ml
Kiwi	Bial	20 mg/ml
Manzana	Bial	26.75 mg/ml
Melocotón pulpa y piel	Bial	26.75 mg/ml
Melocotón	ALK- Abelló	30 µg prot/ml
Plátano	Bial	20 mg/ml
Aguacate	Leti	430 µg prot/ml
Lechuga	Leti	5 mg/ml
Tomate	Bial	20 mg/ml
Judía verde	Leti	10 mg/ml
Guisante	Leti	10 mg/ml
Lenteja	Leti	10 mg/ml
Soja	Bial	3.35 mg/ml
Cereales	Bial	3.35 mg/ml
Mostaza	Bial	20 mg/ml
Profilina	Leti	50 µg/ml
LTP	Bial	0.1 mg/ml.
Control negativo	Leti	NaCl al 0.9%
Histamina	Bial	10 mg/ml

Tabla 6. Pruebas cutáneas con batería de alimentos vegetales

Las pruebas cutáneas se realizaron en la superficie anterior del antebrazo. La lanceta utilizada fue del mismo tipo para todo el estudio (ALK-LANCET, ALK-Abelló, Denmark), utilizando una lanceta para cada prueba para evitar problemas de contaminación.

Tanto en el SPT como en el SPPT, como control positivo se utilizó hidrocloreto de histamina (10 mg/ml) y como control negativo cloruro de sodio (NaCl al 0.9%) (LETI Laboratorios, S.L., Barcelona, Spain). A los 15 minutos de realizar las pruebas se procedió a la lectura de los resultados. Fueron consideradas pruebas positivas aquellas que presentaron una pápula de diámetro 3mm mayor que la obtenida con el control negativo [200].

3.5. Determinación de IgE total y específica.

Se realizaron determinaciones de IgE total e IgE específica para lechuga, melocotón y Pru p 3 automáticamente en un analizador de enzoinmunoensayo con lectura fluorométrica, CAP-FEIA®125 ImmunoCAP® (Phadia, Thermo-Fisher). Además se determinaron los niveles de IgE específicas para extracto completo de los pólenes y alimentos para los que habían resultado positivas las pruebas cutáneas.

Los resultados de las IgE específicas se expresaron en kU/l, considerándose positivos valores por encima de 0.35 kU/l.

3.6. Determinación de IgE específica a un panel de alérgenos purificados por microarray

Además de las determinaciones de IgE específica a extractos completos, se determinaron los niveles de IgE específica a un panel de 103 ó 112 alérgenos, según disponibilidad, utilizando el biochip ImmunoCAP-ISAC® (Phadia, Thermo Fisher Scientific).

El ISAC-112 (*Immuno Solid-phase Allergen Chip*) es una micromatriz comercial con proteínas que permite analizar de forma simultánea la presencia de IgE específica frente a más de cien alérgenos diferentes. Los lugares de reacción del biochip se incuban con 30µl de suero durante 2 horas a temperatura ambiente, realizándose posteriormente lavados con tampón TBS-T (cloruro de sodio 150 mM, Tris base 10 mM, y Tween 20 0,5%, pH 8,0) durante 30 minutos. Se incubaba con anticuerpo anti-IgE humana (ThermoFisher Scientific) marcado con fluoróforo Cy3 durante una hora. Posteriormente se escanea el biochip en el scanner proporcionado por el fabricante (ScanArray GX Microarray Scanner (Perkin Elmer)) y el análisis final se realiza mediante un programa automatizado en ordenador. Se crea una curva patrón mediante calibración del suero analizado en cada uno de los cuatro puestos (lugares) y con esta curva patrón las intensidades fluorescentes se transforman en concentraciones de IgE específica en unidades ISU (ISAC Standardised Units) que corresponden a niveles de anticuerpos IgE en rangos de ng/ml (límite de detección: 0.01 ISU-E) [201] [202] [203].

3.7 Pruebas de provocación

El protocolo de provocación con lechuga se realizó siguiendo las guías con escalado de dosis [63] [64].

Paulsen [193] realizó prueba de provocación con dosis total de 45 gramos de lechuga, por lo que decidimos llegar a esa cantidad. Se realizaron incrementos de dosis cada 15 minutos, con dosis de 1, 3, 6, 12 y 28 gramos de lechuga. La prueba finalizaba cuando acababan los 45 gramos (tolerancia) o si aparecían síntomas (alergia).

Los pacientes que habían presentado reacciones sistémicas severas con lechuga, así como pacientes con reacciones típicas, recientes, repetidas e inequívocas, que presentaban pruebas cutáneas positivas, no se sometieron a prueba de exposición oral para diagnosticarlos de alérgicos a lechuga.

3.8 Estudios inmunológicos

El estudio inmunológico se llevó a cabo en la Fundación del Instituto de Investigaciones Sanitarias-Fundación Jiménez Díaz (FIIS-FJD). El listado de soluciones empleado para los ensayo se muestra a continuación.

3.8.1. Listado de soluciones tampones:

- **PBS** (Phosphate Buffered Saline): 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 y 150 mM NaCl, pH 7.4
- **PBS-T 0,1%**: PBS con 0,1% (v/v) de Tween 20. (Sigma).
- **PBS-T 0,05%**: PBS con 0,05% (v/v) de Tween 20.
- **Tampón de carga de electroforesis**: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 10% (p/v) glicerol, 5% (p/v) 2-β-mercaptoetanol y 0.02% (p/v) azul de bromofenol
- **Tampón de electroforesis**: 0,025 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.192 M Glicina y 0,1% (p/v) SDS.
- **Tampón NET 10X**: 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 0.05 M EDTA, 0.5% (v/v) Tritón X-100, pH 7.5.
- **Solución Azul de Coomasie R-250**: 0.3% (p/v) Coomasie Brilliant Blue R-250, 45% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético.
- **Tampón de transferencia**: 4.8 mM Tris-HCl, 3.9 mM Glicina 20% (v/v) metanol y 0.036% (p/v) SDS.
- **Tampón de bloqueo (Western blot)**: PBS-T 0,1%, 3% (p/v) leche desnatada, 3% (p/v) de albumina de suero bovino (Bovine Serum albumine, BSA),
- **Tampón de transferencia**: 4.8 mM Tris-HCl, 20%(v/v) metanol y 0.036% (p/v) SDS.

- **Tampón de bloqueo ELISA:** PBS-T 0.05% con 2% de BSA.

3.8.2. Preparación del extracto de lechuga

Adaptando el método utilizado por Bascones [180], se preparó el extracto de lechuga con lechuga romana (*Lactuca sativa* variedad *Longifolia*), la variedad más consumida en España. Se trituraron 200 gramos de lechuga y se homogenizaron en 100 mL de acetona a -60°C y se dejó toda la noche a -80°C en congelador. Al día siguiente se dejó atemperar y las muestras se centrifugaron a $4500g$ durante 15 min a 4°C . El precipitado se lavó tres veces con acetona a -60°C , se liofilizó y se disolvió en PBS y se dejó en extracción toda la noche a 4°C bajo agitación constante. Al día siguiente se volvió a centrifugar ($14000g$ durante 45 min a 4°C) y el sobrenadante fue dializado frente a NH_4HCO_3 0.1M, se liofilizó y disolvió en PBS.

Para los experimentos in vitro, la concentración de los extractos de lechuga se ajustaron a 1 mg/mL.

Por último, el extracto se cargó en una columna de desalado (HiTrap Desalting, GE Healthcare) para eliminar colorantes y demás contaminantes que se mantienen durante el proceso de extracción de proteínas.

3.8.3. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas del extracto de lechuga se determinó según el método de Bradford [204], utilizando el reactivo azul de Coomassie Plus (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La separación de proteínas por electroforesis se realizó según el método de Laemmli [205] usando los sistemas Hoefer SE 600 electrophoresis system (GE Healthcare). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron los Broad Range (Bio Rad), que miden masas moleculares de entre 6.5 a 200 kDa.

Se usaron geles de poliacrilamida a concentración de 14% para el gel separador y 5% para el gel concentrador. Las muestras se prepararon en tampón de carga y, posteriormente, se desnaturalizaron calentando 5 minutos a 95°C . Se aplicaron 20 μg de proteína por carril y 5 μg de proteína purificada. Las muestras se mezclaron con tampón de electroforesis en condiciones reductoras y los geles se corrieron a una intensidad de 7mA durante toda la noche en el sistema Hoefer SE 600.

Para asegurar la correcta separación y visualización de las proteínas, los geles se tiñeron con azul de Coomassie Page Blue Protein Staining Solution (Fermentas International, Inc., Canadá), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8.5 Ensayo de inmunodetección

3.8.5.1 Transferencia electroforética

Después de separar las proteínas del extracto, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) siguiendo el método usado por Towbin et al [206] de transferencia semiseca durante 30 minutos a 10 voltios.

Para comprobar la correcta transferencia las membranas se tiñeron con colorante Rojo Ponceau® (Sigma) para visualizar las bandas proteicas. Los marcadores de peso molecular se marcaron sobre una base de cristal con un lápiz de carbón. Se realizaron lavados con PBS-T 0.1% para eliminar los restos del colorante antes de ser bloqueadas.

3.8.5.2. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa

Tras la transferencia, se bloquearon las membranas con PBS-T 0.1%, leche desnatada en polvo al 3% (p/v) y 3% (p/v) BSA durante 2 h a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 4 °C con los sueros de los pacientes diluídos 1:10 en tampón NET 1X.

Al día siguiente, tras lavar 5 veces durante 5 minutos con PBS-T 0.1%, las membranas se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgE humana conjugado con peroxidasa (Nordic, Cultek) diluido 1:5000 en PBS-T 0.05% y 1.5% de leche desnatada.

Finalmente, tras cinco lavados con PBS-T, las bandas de proteínas fueron visualizadas usando un sistema de quimioluminiscencia enzimática potenciada, ECL (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Los ensayos de inmunoblot (Western blot) se realizaron con los 42 sueros individuales de los pacientes alérgicos a lechuga. Además se utilizaron cinco sueros de pacientes alérgicos a lechuga como mezcla de sueros positivo. Los criterios para la inclusión de los sueros de los pacientes en el pool de sueros fueron alto nivel de IgE específica a lechuga, disponibilidad de suero y alérgicos a lechuga sin alergia a melocotón. Los sueros de cinco pacientes no atópicos se usaron como control negativo.

Para los ensayos de inmunoblot inhibición, los sueros de pacientes alérgicos se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente con 100 µg de inhibidor por mililitro de suero.

3.8.6. Estudio de Proteómica

3.8.6.1.- Identificación de Proteínas alergénicas y caracterización por espectrometría de Masas

Las bandas de proteínas reconocidas por más del 50% de los pacientes fueron seleccionadas para estudio. Dichas bandas fueron cortadas del gel con un bisturí estéril [207] y enviadas al Servicio de Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid para su identificación. Las proteínas se identificaron por medio de un espectrómetro de masas, usando MS/MS (espectrometría de masas en tandem) como se describió previamente [208].

La identificación se realizó buscando las secuencias no redundantes en una base de datos (NCBI) utilizando el programa Mascot. Se utilizó una tolerancia de la masa monoisotópica menor a 50 ppm, permitiendo la falta de una escisión de la enzima de restricción. Entre las modificaciones permitidas se encuentran la carbamidometilación de las cisteínas (modificación fija) y la oxidación de las metioninas (modificación variable).

3.8.6.2- Purificación de taumatina de lechuga nativa

Para purificar la taumatina de lechuga se usó el sistema Agilent OffGel 3100. La separación de proteínas basadas en el punto isoeléctrico fue realizado en el 3100 OFFGEL Fractionator usando el OFFGEL Kit pH 4-7 (ambos de Agilent Technologies) con una configuración de 12 pocillos según el protocolo del proveedor. Quince minutos antes de la carga de la muestra, las tiras de gel IPG con un gradiente lineal de pH de 4 a 7 se rehidrataron en el sistema con 0,7 ml de tampón de isoelectroenfoque por pocillo. Un total de 1 mg del extracto de lechuga se diluyó en tampón de isoelectroenfoque a un volumen final de 1,8 ml y 150 µl de muestra se cargaron en cada pocillo. La muestra se enfocó con una corriente máxima de 50 µA. El punto experimental isoeléctrico de la taumatina de lechuga estaba en el rango de pH entre 5.50-6.00. La taumatina de melocotón purificada fue proporcionada por el grupo de la Dra. Araceli Díaz Perales del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), según el protocolo previamente descrito por Palacín et al [126].

3.8.7- Enzimoinmunoensayo (ELISA)

3.8.7.1 ELISA indirecto

Para la realización de ELISA, se usaron las placas de poliestireno de 96 pocillos (Immunolon 4HBX, Thermo) de fondo plano y alta capacidad de unión. Se tapizaron los pocillos del ELISA

MATERIAL Y MÉTODOS

con el extracto de lechuga por duplicado y se incubaron toda la noche a 4°C con 1µg de extracto de lechuga diluidos en tampón de recubrimiento para ELISA (0.05 M carbonato-bicarbonato pH 9.6 (Sigma)), en un volumen de 100 µl por pocillo. Transcurrido ese tiempo, las placas se lavaron tres veces con 100 µl por pocillo de PBS-T 0.05% y se bloquearon los pocillos con PBS-T 0.05% y 2% BSA durante 1h a temperatura ambiente. Después del bloqueo las placas se lavaron 3 veces con PBS-T 0.05%. Las placas fueron entonces incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con los sueros de los pacientes diluídos a 1:10 en tampón de bloqueo. Posteriormente fueron lavadas otra vez con PBS-T 0.05% e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgE humana conjugado con peroxidasa (Nordic, Cultek) diluido 1:5000 en PBS-T 0.05% con 2% de BSA. Tras repetir los lavados se revelaban de las placas con el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametil Benzidina (TMB, sustrato ultrasensible, Chemicon) para medir la reactividad IgE. La absorbancia se determinó a 620 nm, a los 5 min, sin necesidad de parar la reacción. La lectura de cada placa se realizó mediante el aparato lector TECAN infinite F200, con el software "I-Control 1,6", leyendo a una absorbancia de 620 nm. Los sueros de cinco pacientes no atópicos se usaron como controles negativos. La reactividad IgE se consideró positiva cuando la densidad óptica (DO) a 620nm fue dos veces superior que el control negativa a la DO a la misma absorbancia.

3.8.7.2 ELISA Inhibición

Para los ensayos de ELISA inhibición, los sueros de los pacientes alérgicos a lechuga se pre-incubaron durante 4h a temperatura ambiente con distintas cantidades del extracto proteico de lechuga. Las cantidades de inhibidor utilizadas variaban de 10^{-5} a 10^{-1} µg de inhibidor (proteína purificada) por ml de suero. Se centrifugaron y se diluyeron 1:10 en tampón de bloqueo de ELISA. Posteriormente se transfirieron a la placa previamente tapizada y bloqueada, siguiendo el mismo protocolo que para el ELISA indirecto.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición obtenido frente a una concentración de inhibidor:

$$\% \text{ inhibición} = 100 [1 - (\text{DO}_{\text{obs}} - \text{DO}_{\text{bla}}) / (\text{DO}_{\text{max}} - \text{DO}_{\text{bla}})]$$

DO_{obs}: densidad óptica observada en presencia de inhibidor.

DO_{max}: densidad óptica en ausencia de inhibidor.

DO_{bla}: densidad óptica en ausencia del antígeno tapizado.

3.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 20.0. Las variables cualitativas se presentaron con tablas de frecuencias, y la relación entre dos variables cualitativas se evaluó mediante tablas de contingencia con el estadístico chi-cuadrado. Las variables cuantitativas se expresaron en medianas y rango intercuartílico y el análisis de asociación entre dos variables cuantitativas se realizó con la prueba no paramétrica de U-Mann Whitney. Un valor de p de 0.05 ó inferior se consideró como estadísticamente significativo.

MATERIAL Y MÉTODOS



4. RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. Pacientes

Se incluyeron 42 pacientes con historia inequívoca de alergia a la lechuga por anamnesis y demostración de IgE específica a extracto de lechuga por prueba cutánea y/o IgE específica sérica y/o prueba de exposición oral con el alimento. El estudio in vitro de caracterización alérgica se realizó sobre los 42 pacientes, mientras que el análisis de las características clínicas se hizo sobre un subgrupo de 30 pacientes.

La distribución por géneros fue de 14 hombres (33.33%) y 28 mujeres (66.66%). La mediana de edad de los pacientes fue de 34 años (rango de edad 16-60 años).

4.2. Cuestionario clínico-epidemiológico

En cuanto a los antecedentes familiares de atopia, el 43.33% de ellos tenían antecedentes familiares positivos de atopia.

Todos los pacientes presentaban síntomas al comer lechuga, además de SPT y/ o SPPT positivos y/o IgE específica positiva a lechuga.

En cuanto a la sintomatología presentada por los pacientes los síntomas clínicos con lechuga fueron predominantemente graves, con 60% (18/30) pacientes que sufrieron anafilaxia tras la ingesta de lechuga principalmente en el contexto de cofactor implicado (13/18).

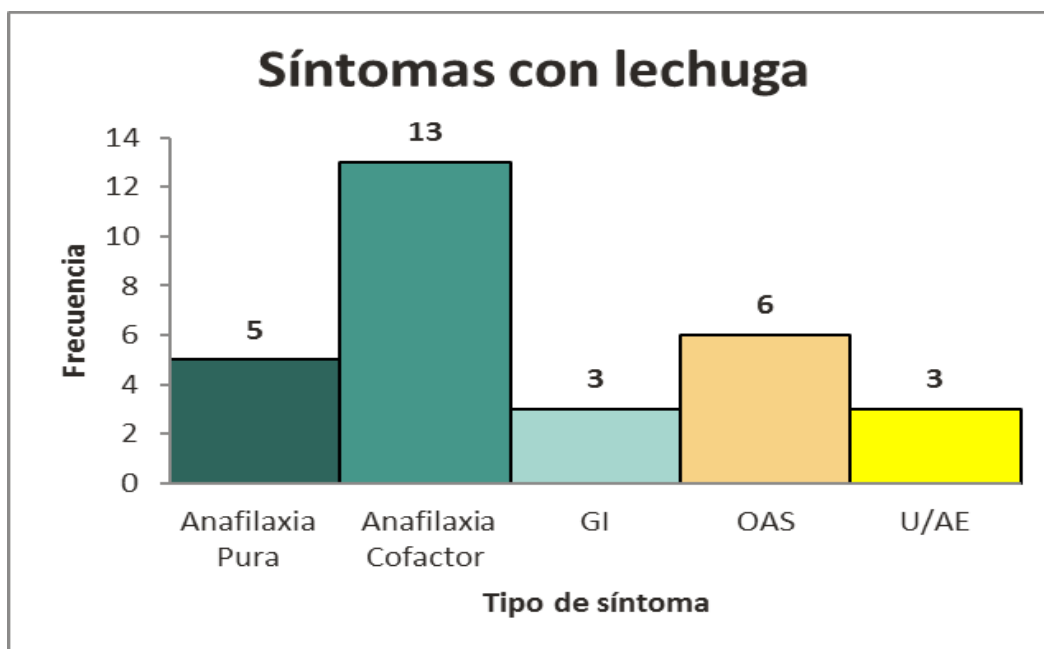


Figura 5. Frecuencia de los síntomas presentados por los pacientes tras la ingesta de lechuga.

GI: síntomas gastrointestinales. OAS: síndrome de alergia oral. U/AE: urticaria/angioedema.

RESULTADOS

El síndrome de alergia oral (SAO) y la urticaria/angioedema (U/AE) fueron referidos por el 20% y el 10% de los pacientes respectivamente y 3 pacientes (10%) referían síntomas gastrointestinales (GI) como única manifestación (Véase Figura 5 y 6).

En total las reacciones anafilácticas inducidas por cofactor fueron el 43% de las reacciones, siendo el ejercicio el cofactor más frecuente (53,8%), seguido por los antiinflamatorios no esteroideos (23%). En dos pacientes más de un cofactor estuvo implicado (AINEs, ejercicio y alcohol (OH)).

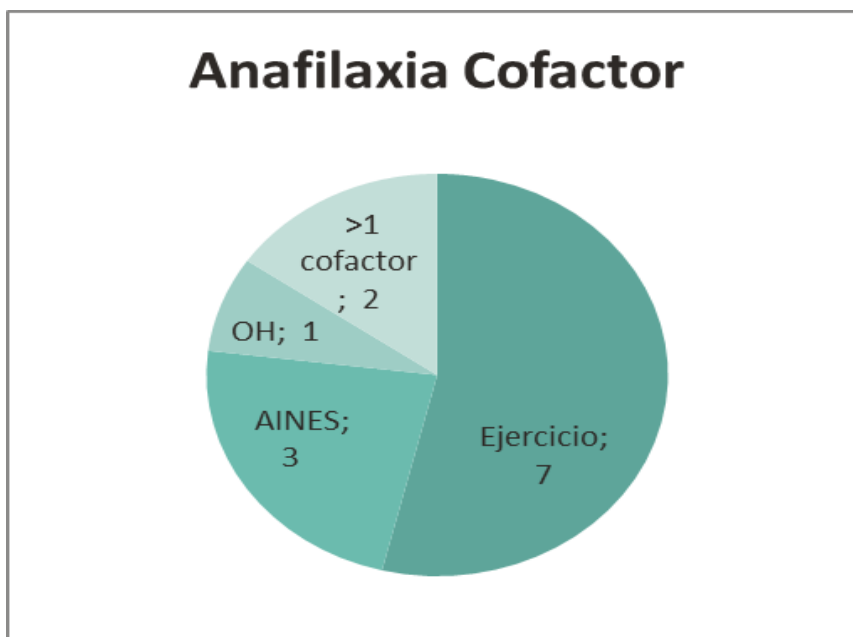


Figura 6. Número de pacientes que preentaban reacciones con cofactores asociados. AINES: antiinflamatorios no esteroideos, OH: alcohol.

La mayoría de los pacientes (90%) tenían historia previa de reacciones alérgicas a otros vegetales, principalmente Rosáceas y frutos secos. El 10% restante, presentaron su primera reacción con lechuga y posteriormente presentaron reacción con otros alimentos vegetales. No existía correlación entre la gravedad de la clínica y el número de alimentos reconocidos por los pacientes.

Todos los pacientes menos uno estaban sensibilizados a melocotón (SPT positivo y/o sIgE), con síntomas que iban desde la urticaria de contacto a la anafilaxia. Las reacciones alérgicas a melocotón fueron predominantemente moderadas, con la mitad de los pacientes presentando únicamente síntomas orales o bien urticaria de contacto (Figura 7).

RESULTADOS

Considerando que 29 de los 30 pacientes alérgicos a lechuga presentaban sensibilización a Pru p 3, y que todos ellos estaban sensibilizados y referían síntomas con más de 2 alimentos vegetales no relacionados, se consideró que el 96.6 % de la muestra tenía síndrome LTP.

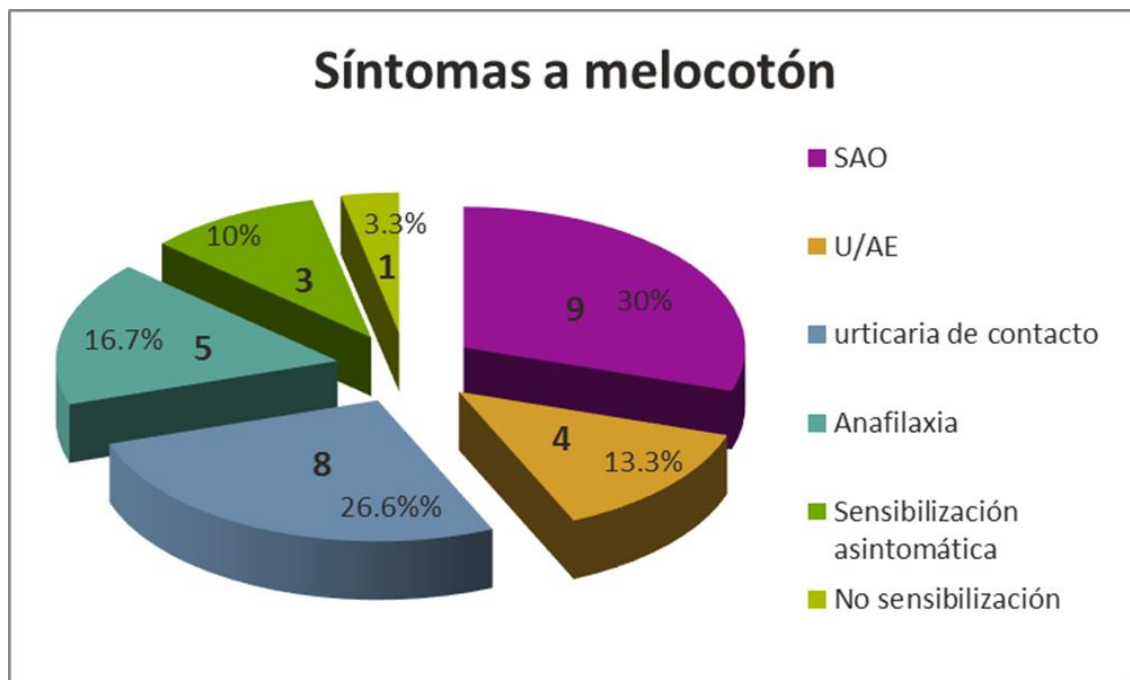


Figura 7. Frecuencia de los síntomas presentados por los pacientes alérgicos a lechuga con la ingesta de melocotón. SAO: síndrome de alergia oral. U/AE: urticaria/angioedema.

La sensibilización a pólenes se encontró en el 90% de los pacientes (véase Figura 10, pruebas cutáneas y síntomas). El 86% de ellos referían síntomas de rinitis y/o asma: 21 pacientes referían clínica de rinitis, 4 pacientes asma bronquial, 1 paciente Rinitis y asma y 4 pacientes no referían sintomatología a pesar de estar sensibilizados a pólenes. La polisensibilización a pólenes y a otros alimentos vegetales no estaba asociado con la severidad de la reacción.

4.3 Pruebas cutáneas

4.3.1. Pruebas cutáneas con lechuga

Las pruebas cutáneas (SPT) con extracto comercial de lechuga fueron positivas en el 60% de los pacientes, por lo que se realizó SPPT con hojas frescas de lechuga romana que fueron positivas en todos los pacientes.

RESULTADOS

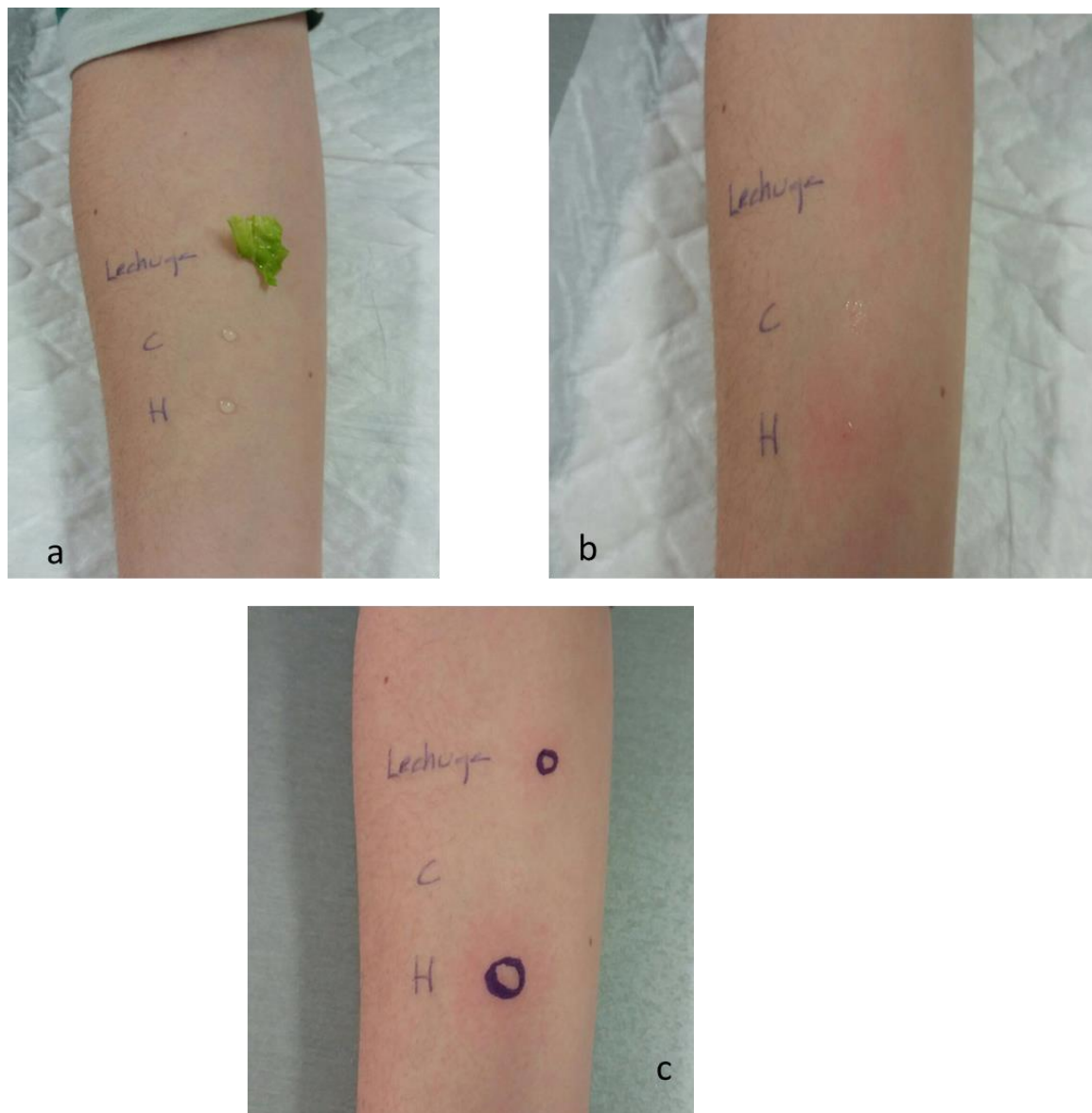


Figura 8. SPPT con hoja de lechuga fresca. a) Realización de SPPT. b) Inmediato tras realización del SPPT. c) Lectura a los 15 minutos (Pápula lechuga 4x4mm, histamina de 7x7mm)

La mediana del diámetro de las pápulas para las pruebas cutáneas con lechuga en SPPT fue de 20mm² (rango 9-49mm²). (Tabla 7).

RESULTADOS

Paciente	Pápula lechuga	Pápula melocotón	Pápula Platanus	Pápula Artemisia
1	5x5	5x5	7x7	Negativo
2	8x5	5x5	6x6	3x3
3	4x4	7x7	4x4	5x5
4	4x4	6x6	Negativo	4x4
5	5x5	13x6	3x3	3x3
6	4x4	4x4	Negativo	Negativo
7	7x7	Negativo	3x3	3x5
8	3x3	4x4	5x5	3x3
9	5x5	6x6	Negativo	Negativo
10	3x3	3x3	6x6	Negativo
11	5x5	5x5	3x3	Negativo
12	6x6	8x8	6x6	7x7
13	5x5	5x5	3x3	Negativo
14	3x3	10x7	4x4	Negativo
15	4x4	8x8	10x10	9x9
16	4x4	8x8	4x4	Negativo
17	4x4	7x7	9x9	Negativo
18	4x4	7x7	3x3	3x3
19	4x4	6x6	3x3	3x3
20	5x5	7x7	Negativo	Negativo
21	4x6	4x4	7x7	4x4
22	4x4	7x7	3x3	3x3
23	6x6	5x5	7x7	3x3
24	6x6	4x4	5x5	4x4
25	3x3	5x5	Negativo	Negativo
26	5x5	7x7	8x8	Negativo
27	5x5	7x7	6x6	3x3
28	5x5	3x3	9x9	4x4
29	3x3	6x6	6x6	5x5
30	3x3	5x5	5x5	5x5

Tabla 7. Tamaño de las pápulas de las pruebas cutáneas a lechuga, melocotón, platanero y artemisia.

4.3.2. Pruebas cutáneas con extractos comerciales de alimentos

Los resultados de las pruebas cutáneas frente a batería de alimentos mostraron que todos los pacientes reconocían otros alimentos vegetales diferentes a lechuga (Figura 9). Las frecuencias de reconocimiento más altas fueron para melocotón y frutos secos.

La medianas del diámetro de las pápulas para las pruebas cutáneas con melocotón fue de 36mm²(rango 0-78mm²), con platanero de 20.5mm² (rango 0-100mm²) y con artemisia 9mm²(rango 9-49mm²). (Tabla 7)

RESULTADOS

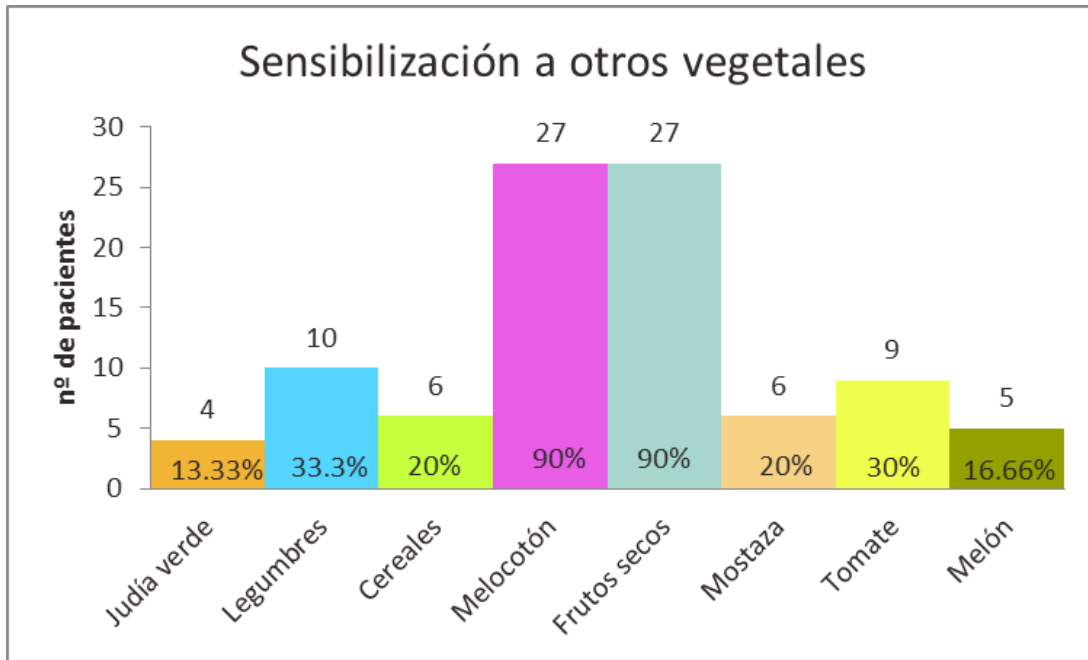


Figura 9. Frecuencia de sensibilización a otros alimentos vegetales de los pacientes alérgicos a lechuga.

4.3.3. Pruebas cutáneas con extracto de pólenes.

Los resultados de las pruebas cutáneas frente a pólenes mostraron que el 90% de los pacientes presentaban sensibilización concomitante a pólenes. El 76.7% estaban sensibilizados a platanero y el 60% a artemisa (Figura 10).

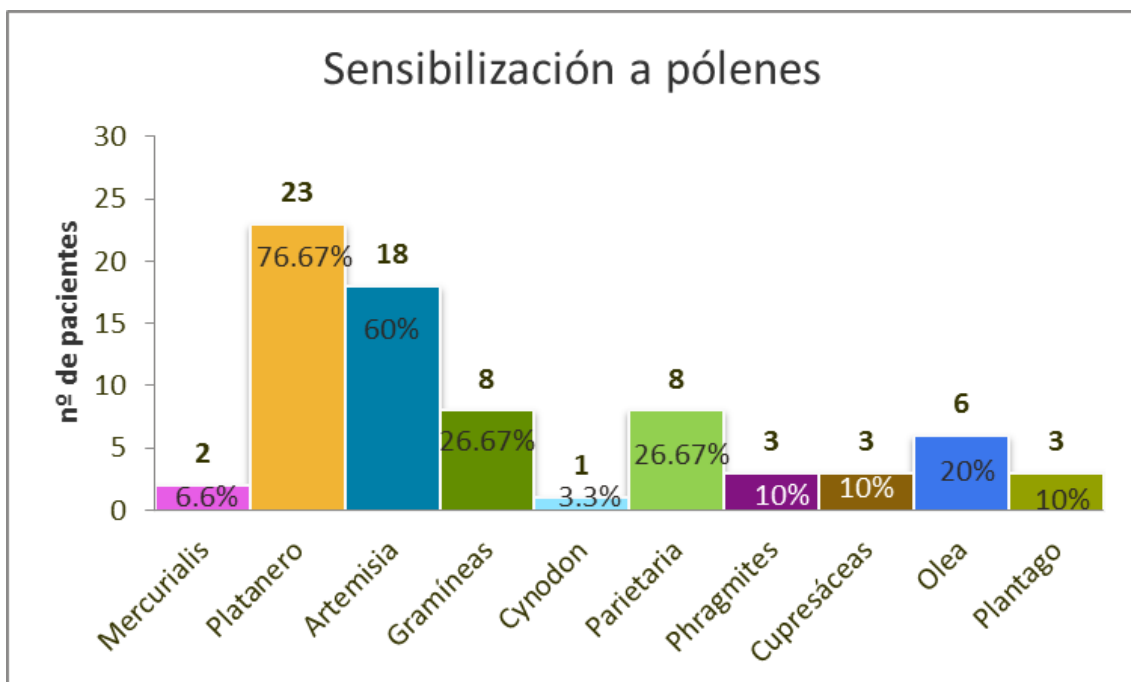


Figura 10. Frecuencia de sensibilización a pólenes de los pacientes alérgicos a lechuga.

RESULTADOS

4.4 Determinación de IgE total y específica frente a lechuga y a un panel de alérgenos purificados por microarray:

Las IgE totales y específicas se determinaron por el método de CAP-FEIA system^{®12} (Phadia-Thermofisher), considerando como niveles positivos aquellos superiores a 0.35KU/L. La IgE total presentaba una mediana de 106.05 kU/L (rango 15.5-2078 kU/L). La IgE específica frente a lechuga fue negativa en 11 pacientes, y globalmente los niveles positivos fueron bajos con una mediana de 0,99 kU/L (rango 0.11-5.97 kU/L).

Pacientes	IgEs lechuga kU/L	IgE Total kU/L	IgE s melocotón Pru p 3 kU/L	ISAC Pru p 3 ISU	IgE s Platanus kU/L	IgE s Artemisia kU/L
1	0,39	52	Negativo	4,3	13.90	Negativo
2	1,06	316	3,57	3,5	88,4	0,71
3	0,51	92,1	4,6	NR	1,76	3,61
4	0,91	366	16,9	NR	Negativo	0,63
5	0.61	25	7,49	33	0,6	0,36
6	0	15,5	2,01	3,5	Negativo	Negativo
7	0.15	27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	0.26	26	1,89	1,9	0,68	0,24
9	2.54	2078	34,7	48	Negativo	Negativo
10	0.06	120	1.02	NR	5,42	Negativo
11	3.86	177	20,6	11	8,37	2,41
12	2.74	149	43,3	NR	2,9	3,35
13	4.3	79	20.10	NR	2.40	Negativo
14	0	54	2,08	NR	1.87	Negativo
15	0.31	71,4	8,57	11	2,94	0,45
16	0.42	23	2,47	2,5	0,67	Negativo
17	0.10	78	0,56	NR	Negativo	Negativo
18	1.81	148	12.6	2,3	4.05	2.0
19	0.96	131	9,89	1,3	4,13	3,48
20	2.06	701	26,10	NR	Negativo	Negativo
21	0.11	198	1,35	2,8	24,5	Negativo
22	1.36	121	7,32	1,5	3,38	2,32
23	0.32	236	16,5	7,1	72,6	0,71
24	1.2	54	9,52	NR	12,4	Negativo
25	0.99	414	53,2	11	3,28	Negativo
26	0.06	64	4,52	NR	Negativo	Negativo
27	1.96	220	45,2	85	4,83	Negativo
28	0,14	74	0,39	Negativo	1,72	0,16
29	5.97	1091	34.3	21	5.27	1.18
30	2.71	37	8,86	16	5.93	2.02

Tabla 8. IgE Totales y específicas frente a lechuga, Pru p 3 de melocotón, platanero y artemisia. NR: no realizado.

Si el punto de corte baja a 0.10 kU/L las positividads frente a IgE específica de lechuga aumentan a 26 pacientes, siendo sólo 4 de ellos negativos. La IgE específica frente a Pru p 3

RESULTADOS

fue positiva en 29 de los 30 pacientes, bien por ISAC o bien por InmunoCAP. Todos estos datos junto a las IgE específicas para Platanero y para Artemisia se muestran en la tabla 8.

Se realizó de ImmunoCAP-ISAC® en 24 de ellos; en 15 pacientes se realizó el ISAC 103 y en 9 el ISAC 112. La sensibilización a al menos 2 LTPs incluidas en el panel, (Pru p 3, Ara h 9, Jug r 3, Cor a 8, Art v 3, y Pla a 3) se observó en 87% de los casos; la distribución de frecuencias se muestran en la Tabla 9.

Sólo en 3 pacientes de los estudiados se detectó sensibilización a otros alérgenos vegetales incluidos en el panel de microarray (profilina, homólogos de Bet-v1, taumatina, proteína transportadora del calcio, vicilina, 2s-albumina, albumina 11-s, gliadina, papain-like cistein proteasa y expansina). Un paciente estaba sensibilizado a la thaumatin-like protein de kiwi (TLP) y 2 pacientes, con polinosis por gramíneas, estaban sensibilizados a profilinas.

Alérgeno	ISAC 103 Nº positivo/ total	ISAC 112 Nº positivo/ total	Sensibilización global (%)
Pru p 3	14/15	7/9	87.5%
Jug r 3	NP	7/9	78%
Ara h 9	NP	6/9	67%
Cor a 8	10/15	4/9	44%
Pla a 3	NP	7/9	87.5%
Art v 3	10/15	4/9	44%
Homólogos Bet v1	0/15	0/9	0%
Profilinas	0/15	2/9	8,3%

Tabla 9: Frecuencia de sensibilización a LTPs, profilinas y homólogos de Betv 1 por ImmunoCAP-ISAC®. NP, no presente.

4.5. Pruebas de Provocación

Las provocaciones se realizaron en abierto, con el alimento en fresco, excepto en aquellos pacientes que tenían SPT positivos, IgE específica positiva a lechuga y una historia convincente de anafilaxia inmediata tras la ingesta de lechuga en el año previo.

Diecinueve de los treinta pacientes se autoprovaron creyendo que la lechuga no podía ser el causante. De éstos, 13 toleran sin cofactor, de los seis restantes tres presentaron síntomas

gastrointestinales, uno SAO, otro urticaria generalizada y angioedema facial y una paciente anafilaxia que requirió atención en urgencias y administración de adrenalina. A nueve pacientes no se les realizó prueba de provocación, cuatro por anafilaxia y 5 por miedo de repetir reacción. A las dos pacientes que se les realizó provocación, una paciente presentó anafilaxia con aparición de urticaria generalizada, epigastralgia, vómitos y deposición diarreica, requiriendo adrenalina. La segunda paciente presentó tras la dosis total de lechuga sensación de opresión faríngea y prurito genital autolimitado y no requirió administración de medicación alguna. Se le propuso repetir provocación, pero no quiso y evita lechuga por miedo.

No se encontró ninguna relación significativa entre los síntomas y las bandas, tampoco entre los síntomas con la IgE específica ni con la pápula de lechuga. En el análisis multivariante con regresión múltiple la IgE de melocotón se asocia con la IgE de lechuga ajustado por edad y sexo ($p=0,005$), pero no se asocia con el área de la pápula. Tampoco hay asociación entre la IgE de lechuga y el área de su pápula ($R=0,039$; $p=0,84$). No se pudo demostrar correlación entre gravedad de los síntomas y los niveles de IgE específica para lechuga, o Pru p 3 de melocotón.

4.6. Estudio Inmunológico

4.6.1.- Extracto a de lechuga

Con el fin de estudiar las principales proteínas implicadas en la respuesta alérgica a lechuga, se realizó un extracto partiendo de lechuga variedad romana (*Lactuca sativa longifolia*). Se realizó un protocolo de extracción que posteriormente se cargó en una columna de desalado para eliminar colorantes y demás contaminantes durante el proceso de extracción de proteínas.

El SDS-PAGE del extracto de lechuga mostró múltiples bandas de proteínas con peso molecular (PM) entre 8 a 200 kDa (figura 11).

Las bandas más intensas se observaron cerca de 9, 26, 35, 45, 60 y 66 kDa, bajo condiciones reductoras y no reductoras.

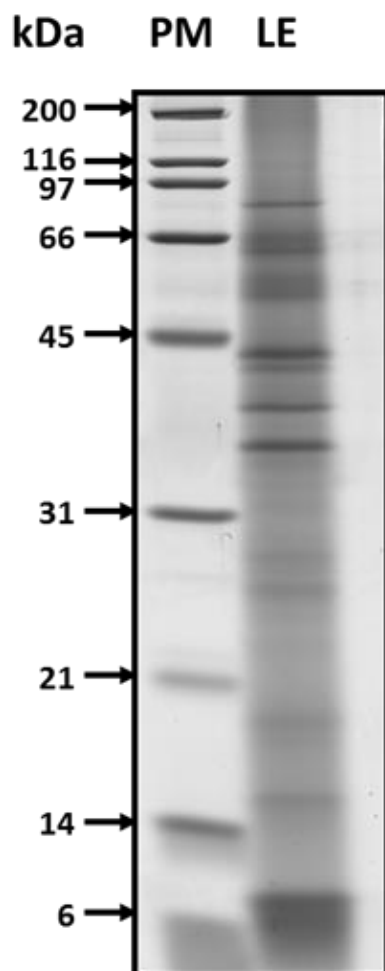


Figura 11. SDS-PAGE de extracto de lechuga. LE: extracto de lechuga (*lactuca sativa*). PM: marcadores de peso molecular (kDa).

4.6.2. Ensayos de Inmunodetección (Western blot)

Para detectar las bandas fijadoras de IgE que reconocían los pacientes alérgicos a lechuga se realizaron pruebas de inmunodetección (Western blot) con sueros individuales de pacientes alérgicos a lechuga. Se utilizó la mezcla de sueros de pacientes no alérgicos como control negativo (figura 12).

RESULTADOS

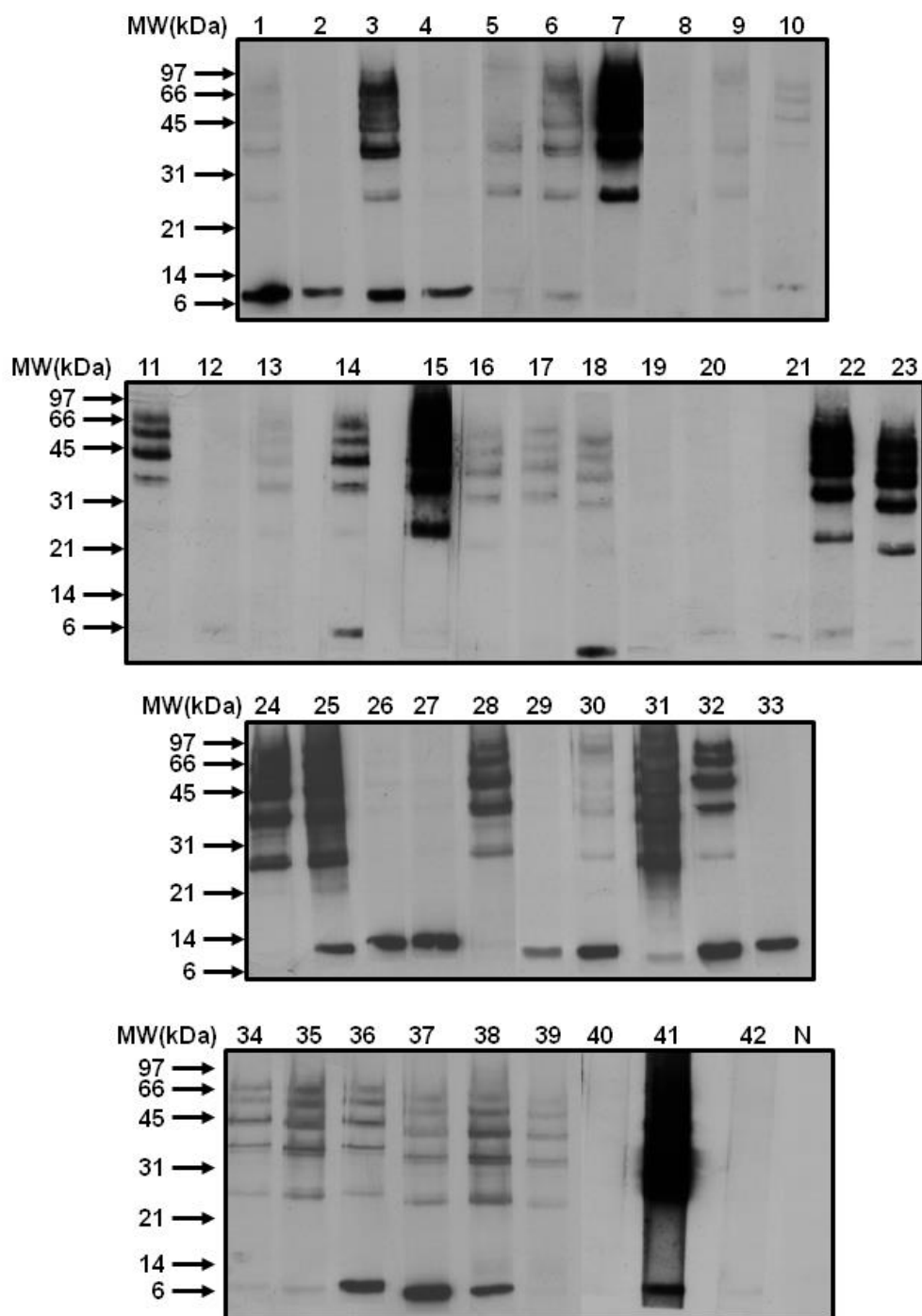


Fig. 12 .Ensayos de Inmunodetección con sueros individuales de pacientes alérgicos a lechuga. Carriles 1-42 representan los sueros de los 42 pacientes. Línea N representa el control negativo con una mezcla de sueros de pacientes no atópicos. PM: Marcadores de PM (kDa).

Se observó que más del 50% de los pacientes reconocían bandas fijadoras de IgE con un peso aproximado de 9, 26, 35, 45, 60 y 66 kDa. La frecuencia de reconocimiento de las bandas proteicas fijadoras de IgE del extracto de lechuga se muestra en la tabla 9.

RESULTADOS

Para comprobar la especificidad de la unión de la IgE de los pacientes al extracto de lechuga se realizó un western blot inhibición preincubando con extracto de lechuga una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a lechuga. (Figura 13). Se observó que la unión era específica, ya que se inhibía totalmente la fijación de IgE (carril 2, figura 13).

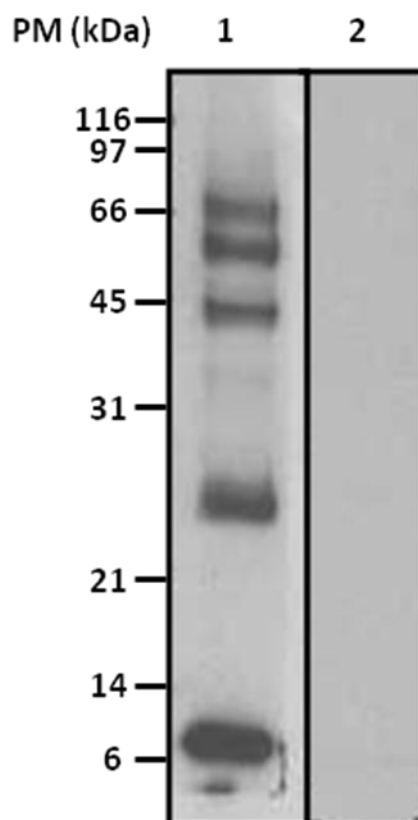


Fig.13. Western blot inhibición.

Carril 1: Inmunodetección con mezcla de sueros de pacientes alérgicos a lechuga.

Carril 2: Inmunodetección con mezcla de sueros de pacientes alérgicos a lechuga previamente incubados con extracto de lechuga.

PM: marcadores de peso molecular (kDa).

4.6.3 Estudios de Proteómica.

4.6.3.1 Identificación y caracterización de proteínas alergénicas mediante técnica de espectrometría de masas.

La identificación de las bandas fijadoras de IgE se hizo por MS/MS y se obtuvo la secuencia de varios péptidos internos (tabla 10).

Los alérgenos principales de lechuga (bandas 9, 26, 35, 45, 55 y 66 kDa), reconocidos por más del 50% de los pacientes fueron analizados y la identificación de proteínas se realizó buscando

RESULTADOS

las secuencias no redundantes en una base de datos (NCBI) utilizando el programa MASCOT. (<http://www.matrixscience.com>).

La búsqueda con la base de datos de proteínas (MASCOT) permitió la identificación de una banda de proteína de 9kDa como una proteína de transferencia de lípidos (LTP). El reconocimiento de Lactoglobulina 1 (9kDa) por inmunoblotting se encontró en el 73.8% de los pacientes.

La proteína de 26 kDa mostró una alta concordancia con thaumatin-like protein (TLP) de *Sambucus nigra*, *Isatis tinctoria* and *Brassica rapa subsp. pekinensis*. La correspondencia encontrada entre la secuencia de péptidos internos de lechuga TLP y TLP especies relacionadas fue de 100%. Dicha proteína fue reconocida por el 69% de los pacientes.

Para las bandas de 35 y 45 kDa el reconocimiento fue del 71.4% y la secuencia de péptidos tenía una gran homología con proteínas de la familia de las aspartil proteasas.

Peso molecular estimado por SDS-PAGE (kDa)	Frecuencia de reconocimiento de los pacientes	Péptidos	Identificación
9	31/42 → 73.8%	NGGTPPQCCTGVR	Lipid Transfer protein
26	29/42 → 69%	TNCNFDASGR APGGCNPCTVFPR	Thaumatococcus-like protein
35	30/42 → 71.4%	AFDNPTGGGTLLDSGTVFTR TTGSSIPPKGVLGIGR	Aspartyl protease family protein
45	30/42 → 71.4%	AFDNPTGGGTLLDSGTVFTR LVDGAYTAVRDEFR VLFDLPNSR	Aspartyl protease family protein
55	27/42 → 64.3%	SSLSDILSR	No significant identity
66	27/42 → 64.3%	EELLTPYVSKNPR LAVIIGFR	No significant identity

Tabla 10. Análisis de las bandas de proteínas fijadoras de IgE del extracto de lechuga. Frecuencia de reconocimiento por sueros de pacientes alérgicos en inmunoblotting e identificación de las proteínas por MS/MS.

4.6.3.2.- Purificación de la TLP alergénica de lechuga.

Dado que la taumatina está considerada como un panalérgeno quisimos purificarla para determinar el porcentaje de sensibilización a este alérgeno en nuestra población. Se realizó la purificación según se ha descrito en material y métodos y posteriormente se analizó por SDS-

RESULTADOS

PAGE y Western blot. La proteína purificada de lechuga de 26 kDa se analizó por MS/MS y se identificó como una thaumatin-like protein de acuerdo con la secuencia de péptidos internos obtenida: TNCNFDASGR y ASTMSCPGGTNYR. Los péptidos identificados a partir de la taumatina purificada de lechuga eran los mismos que los previamente identificados junto con un péptido adicional (ASTMSCPGGTNYR) probablemente debido a la mayor pureza de la TLP purificada.

La actividad fijadora de IgE de la taumatina purificada de lechuga se mantuvo durante todo el proceso, y se confirmó por los inmunoblots realizados con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a lechuga y que reconocían la banda de 26 kDa (Fig. 14).

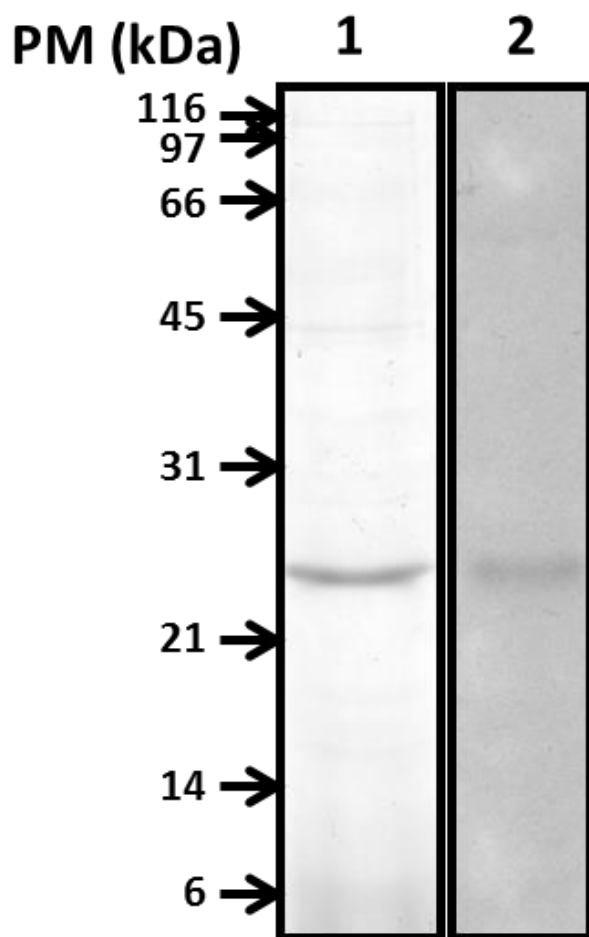


Fig. 14. Taumatina Purificada de lechuga. Carril 1: Análisis mediante SDS-PAGE de la proteína de 26 Kda purificada en condiciones reductoras. **Carril 2:** Análisis de la proteína purificada mediante Western Blot en condiciones reductoras con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a lechuga.

4.6.4. ELISA y ELISA Inhibición

Para probar que la actividad fijadora de IgE era la misma que la de la taumatina natural contenida en el extracto completo, se realizó ensayo de ELISA inhibición usando extracto de lechuga en la fase sólida, con una mezcla de sueros de pacientes que reconocían la TLP en los estudios de western blot. La taumatina purificada inhibió la capacidad fijadora de IgE de la mezcla de sueros de los pacientes alérgicos a lechuga de forma dosis-dependiente, con la inhibición más alta (37%) observada a 100µg/ml de concentración del inhibidor (Fig. 15). No se observó ningún efecto inhibitorio en el experimento control usando mezcla de sueros de no atópicos.

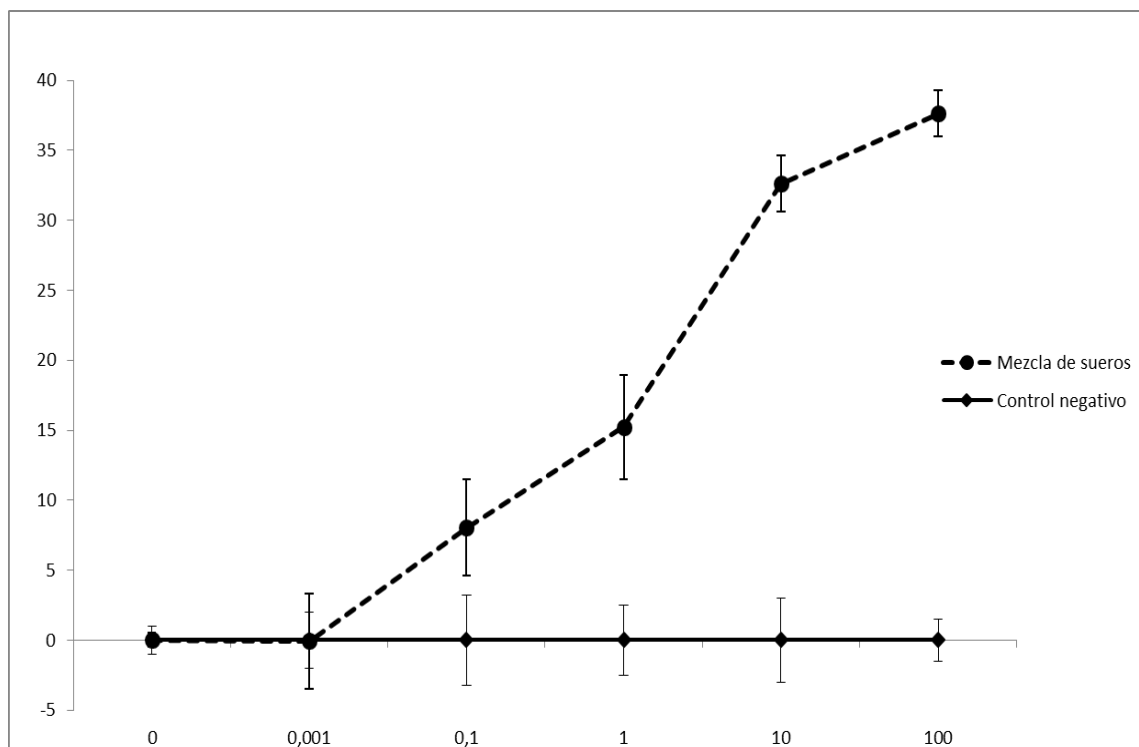


Fig. 15. Ensayo de ELISA inhibición con taumatina purificada de lechuga. El extracto de lechuga (10 µg) se usó en fase sólida y la mezcla de sueros de pacientes fue preincubada con concentraciones crecientes de taumatina purificada de lechuga (línea de puntos). La mezcla de sueros de pacientes no atópicos preincubados con concentraciones crecientes de taumatina purificada de lechuga se usó como control negativo (línea sólida). Todas las pruebas se realizaron por duplicado. Eje ordenadas: Porcentaje de inhibición (%). Eje abscisas: concentración del inhibidor (mg/ml).

4.6.5. Reactividad cruzada entre lechuga y TLP de melocotón.

Para estudiar la reactividad cruzada entre taumatina de lechuga y de melocotón, realizamos un inmunoblotting usando taumatina purificada de melocotón TLP, Pru p 2, con una mezcla de sueros de 5 pacientes alérgicos a lechuga y no alérgicos a melocotón. Para demostrar la reactividad cruzada con la taumatina de lechugas, se realizó ensayo de inmunoblot inhibición usando taumatinas en fase sólida. La taumatina de melocotón fue reconocida por la mezcla de sueros. La pre-absorción con extracto de lechuga o taumatina purificada de lechuga de la mezcla de sueros resultó en una inhibición completa de las bandas fijadoras de IgE (figura 16).

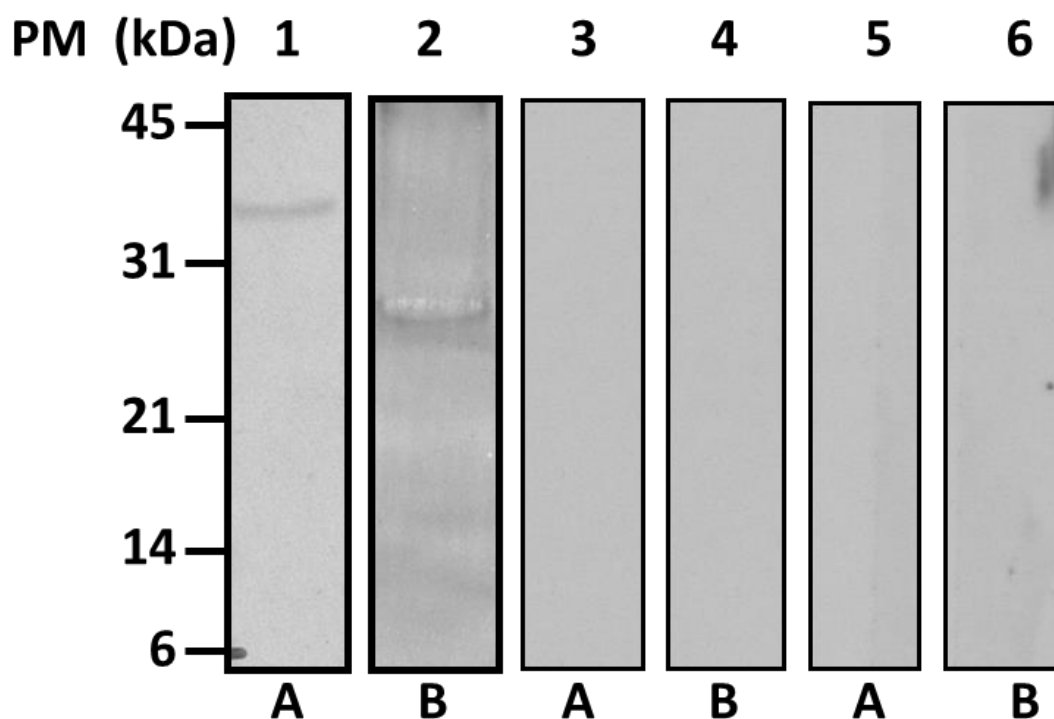


Fig. 16 Análisis mediante western blot de taumatina purificada (1µg) con mezcla de sueros de pacientes alérgicos a lechuga sin alergia a melocotón.

Carril A: Taumatina de melocotón Pru p 2

Carril B: Taumatina purificada de lechuga.

Los carriles 1 y 2 corresponden a la mezcla de sueros de pacientes sin incubar.

Los carriles 3 y 4 corresponden a la preincubación con extracto de lechuga.

Los carriles 5 y 6 corresponden a la preincubación con taumatina purificada de lechuga.

RESULTADOS

En cuanto a la profilina, nuestros resultados muestran que estaba presente en el extracto usado para estudio inmunológico (Figura 17), pero ninguno de nuestros pacientes estaba sensibilizado a profilina.

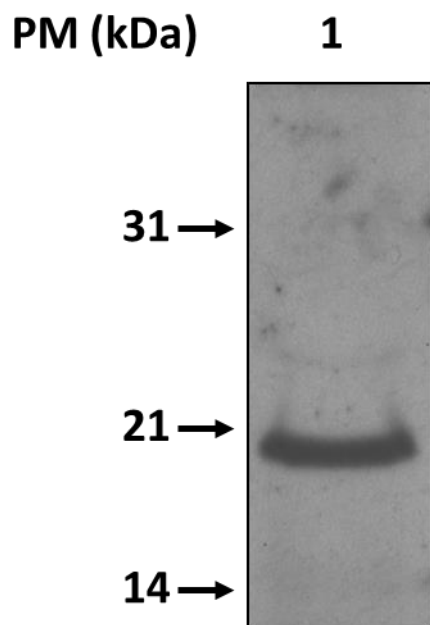


Figura 17. Análisis Western blot del extracto de lechuga bajo condiciones reductoras con anticuerpo antiprofilina de conejo. El anticuerpo antiprofilina de conejo fue el usado en estudios previos [209].



5. DISCUSIÓN

La prevalencia de alergia a alimentos ha aumentado en los últimos años, especialmente la alergia a alimentos vegetales [210] [211] [20] siendo la primera causa de alergia a alimentos en adultos en España.

La mejora en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas pasa por conocer en profundidad las fuentes biológicas con capacidad de inducir alergia. El perfil de reconocimiento alergénico y las características clínicas diferenciales de los diferentes alimentos alergénicos permitirán identificar a aquellos pacientes con más riesgo de presentar reacciones graves y las potenciales fuentes de reactividad cruzada para establecer medidas de evitación.

En el caso de la alergia a la lechuga, las descripciones de su implicación en reacciones alérgicas a alimentos son escasas, principalmente en forma de casos clínicos o series pequeñas, y aunque se conoce que la LTP es un alérgeno principal de la lechuga poco se sabe de sus características clínicas, su potencial reactividad cruzada con otros alimentos vegetales y el papel que podrían tener otros alérgenos relevantes. Con este interés se ha planteado el trabajo de la presente tesis, cuyo objetivo es identificar los alérgenos principales de la lechuga y definir las características clínicas diferenciales de la alergia a lechuga y su potencial implicación en fenómenos de reactividad cruzada con otras fuentes alergénicas.

El diseño del estudio ha comprendido dos partes. Se seleccionaron los pacientes sensibilizados a lechuga y se procedió a la caracterización de los alérgenos principales de lechuga mediante la metodología del análisis proteómico. Paralelamente, se desarrolló el estudio clínico para definir el patrón clínico de presentación de la alergia a la lechuga.

5.1. Características clínicas de la alergia a lechuga.

Hasta la fecha esta es la mayor serie de pacientes alérgicos a la lechuga descrita en la literatura, donde la descripción de la alergia a lechuga se basaba principalmente en casos clínicos aislados y únicamente hay publicados dos estudios con 14 pacientes el primero [160] y con 29 pacientes el segundo [167] que presentan un número significativo de pacientes. Los estudios de alergia a lechuga publicados se han centrado principalmente en el estudio de la LTP.

La mayoría de los pacientes incluidos en este estudio fueron mujeres (66%), lo que va en consonancia con lo descrito en alergia a alimentos en estudios epidemiológicos previos [13] [15] [16] [17] y en concreto en los estudios realizados en alergia a lechuga [160] [167]. Además de afectar predominantemente al género femenino, la alergia alimentaria es típicamente una

DISCUSIÓN

patología que afecta a gente joven [160] [167] [1], la mediana de edad de nuestros pacientes (34 años) lo refrenda.

Respecto a la expresión clínica de la alergia a lechuga, los síntomas fueron predominantemente graves, tal y como ya había sido descrito previamente en otras series y casos clínicos [160] [167] [176] [180] [179] [175] y apunta a la implicación de un alérgeno estable y resistente a la digestión enzimática como responsable de las reacciones. En nuestra población de estudio el 60% de los pacientes presentaron una anafilaxia con la ingesta de lechuga.

Destaca que la mayoría de las reacciones anafilácticas se dieron en presencia de uno o más cofactores, mayoritariamente ejercicio seguido de antiinflamatorios no esteroideos y alcohol. En estudio de Cardona y col [24] sobre una serie de 71 pacientes con alergia alimentaria exacerbada por cofactor (CEFA), los alimentos implicados fueron más frecuentemente los vegetales y dentro de estos la lechuga y los cereales. Los alérgenos más frecuentemente implicados fueron las LTPs tal y como se ha descrito en otra serie de pacientes del área mediterránea [114].

La alergia a trigo por reactividad a omega-5-gliadina fue la primera alergia alimentaria descrita por cofactor, en este caso ejercicio. En el área mediterránea la mayoría de los pacientes con alergia alimentaria exacerbada por cofactor se ha comprobado que están sensibilizados a LTP y que solo tienen reacción sistémica cuando además de comer el alimento en cuestión, concurre una circunstancia potenciadora [24] [23] [114] [41].

En muchos casos se necesita la presencia de un cofactor (principalmente ejercicio o AINEs) para desencadenar la reacción, y posteriormente los pacientes pueden tolerar el alimento o bien presentar reacciones más leves en su vida diaria cuando el cofactor no está presente. Por tanto hay que destacar que la expresión clínica de alergia a alimentos que contienen LTP es extremadamente variable, y parece ser dependiente de la presencia o ausencia de cofactores [114] [24] [38] [41] [40]. En nuestros pacientes también se han confirmado estos datos y ello implica que la presencia de cofactores debe ser siempre evaluada durante el estudio de alergia a lechuga y el hecho que se tolere lechuga tras la reacción índice no descarta alergia a este alimento.

En cuanto a las manifestaciones clínicas de los pacientes un porcentaje menor de pacientes presentaron SAO y urticaria/angioedema. En tres casos los pacientes referían síntomas aislados gastrointestinales como única sintomatología cuando ingerían lechuga y

DISCUSIÓN

posteriormente acabaron desarrollando CEFA. En los últimos años se ha descrito que la aparición de síntomas gastrointestinales puede preceder a síntomas de mayor gravedad. Pascal comprobó en su estudio en pacientes con síndrome de LTP que el 55% de los pacientes presentaban síntomas gastrointestinales y señalaba que habría que preguntar específicamente por dichos síntomas al realizar la anamnesis, ya que cuando una LTP está implicada, estos síntomas pueden representar riesgo de reacción de gravedad al concurrir un cofactor [23]. En ese mismo estudio se comprobó también que muchos de los pacientes, a lo largo de su evolución, desarrollaron síntomas al ingerir alimentos que previamente toleraban y el mismo alimento vegetal reportó causar síntomas de distinta severidad en el mismo individuo en diferentes episodios. Esto mismo lo hemos podido comprobar en nuestros pacientes ya que algunos pacientes consideraron el episodio previo de SAO o epigastralgia como un proceso irrelevante que no supieron identificar como reacción alérgica ya que, por una parte la lechuga siempre ha sido considerada un alimento saludable y por otra, rara vez se consume sola y sí acompañada de otros ingredientes vegetales que también pueden ser causantes de reacciones.

Destaca también que todos los pacientes de nuestra serie referían síntomas con otros alimentos de origen vegetal, la mayoría de ellos con frutas de la familia de las rosáceas y con frutos secos que acostumbraron a ser reacciones leves. Curiosamente sólo cinco pacientes presentaron anafilaxia con melocotón, lo que puede deberse al hecho de que después de las primeras reacciones al melocotón esta fruta es frecuentemente evitada, mientras que otros alimentos vegetales que contienen LTP se consumen continuamente. Esto iría apoyado también por el tamaño de las pápulas frente a melocotón que fueron pequeñas y los niveles de IgE específicas bajos, probablemente porque los pacientes evitaban el alimento desde la infancia. En nuestro estudio no se pudo establecer una correlación entre la gravedad de los síntomas producidos por lechuga y el número de alimentos vegetales a los que estaban sensibilizados los pacientes.

Aunque este estudio no fue diseñado de forma prospectiva y por tanto no permite extraer conclusiones sobre la historia natural de la alergia a lechuga, sí parece a la luz de los resultados, que se presenta de forma más tardía después de que el paciente se haya sensibilizado primariamente a otros alimentos vegetales con alto contenido en LTP, principalmente el melocotón. Sólo un 10% de nuestra población de estudio había presentado su primera reacción alérgica con lechuga y posteriormente presentaron reacción con otros alimentos vegetales.

DISCUSIÓN

Las pruebas cutáneas en SPPT con lechuga romana fueron globalmente de pequeño tamaño, y claramente inferior a las del extracto de melocotón, positivo en todos menos un paciente. Las pruebas cutáneas con extracto comercial de lechuga resultaron ser menos sensibles, siendo positivas únicamente en un 60% de los casos y, de nuevo, de pequeño tamaño. Esta baja sensibilidad probablemente obedece a la pobre expresión de todos los alérgenos relevantes en los extractos comerciales de lechuga, que sí estaban representadas en la lechuga natural, por lo que por la baja eficiencia diagnóstica son preferibles las SPPT. Las pruebas cutáneas en SPT con el alimento en fresco, son de preferencia en los alimentos vegetales, hecho que pudimos comprobar en el caso de la lechuga. Además los SPPT se ha demostrado que presentan mayor concordancia con las pruebas de provocación con alimentos [212].

Las pruebas cutáneas con la batería de extractos comerciales de alimentos revelaron que no había ningún paciente monosensibilizado a lechuga, siguiendo el mismo patrón que el descrito en estudios previos con este vegetal [160] [167].

Además de la alergia alimentaria, la mayoría de los pacientes presentaban alergia respiratoria. El 86% de ellos referían síntomas respiratorios, principalmente de rinitis.

Las pruebas cutáneas a la batería de neumalérgenos revelaron un dato relevante. Aunque la sensibilización a pólenes es frecuente entre los pacientes con alergia a alimentos, en este estudio es llamativo que la sensibilización a polen se encontró en el 90% de nuestros pacientes. Se ha descrito la asociación entre la alergia alimentaria mediada por LTP y polinosis en el área mediterránea [158] [93] [114] [23], principalmente con polen LTP de platanero (Pla a 3) [23] [160] [158] [106] [162] [164] y artemisa (Art v 3) [213] [159] [107] [109] [108] [161]. La alta prevalencia de sensibilización a estos pólenes en nuestros pacientes, el 76% a platanero y el 60% a artemisa, apoyaría la hipótesis del síndrome polen-alimentos por sensibilización a LTP en nuestra zona [170] [107]. Sin embargo, el objetivo de este estudio fue caracterizar una muestra de pacientes alérgicos de lechuga y no se incluyó ningún grupo control, por lo que no permite realizar estudios de asociación.

Al igual que en el caso de la prueba cutánea con extracto comercial de lechuga, la sensibilidad de la IgE específica frente a lechuga fue baja, probablemente debido al bajo contenido de alérgenos (no sólo de Lac s 1) en el extractos de lechuga. Esta baja sensibilidad de la IgE específica a lechuga ya había sido observada por Hartz [167] Los valores de IgE específica a lechuga fueron también globalmente bajos y cabe destacar que al considerar positivos valores por encima de 0,1 kU/L aumentaba considerablemente el porcentaje de positividad (86%)

DISCUSIÓN

respecto a situar el punto de corte en 0,35 kU/l (63%). A raíz de esta observación, podría plantearse bajar el punto de corte de positividad en caso de IgE específica a extractos de alimentos vegetales poco estandarizados.

La sensibilización a LTP es la causa más frecuente de alergia alimentaria en el área Mediterránea, con la alergia a melocotón como sensibilizante primario en la mayoría de los casos [114]. Como se señala por los resultados del estudio, la alergia a la lechuga se debe principalmente a la sensibilización a LTP (Lac s 1), lo que está en consonancia con estudios previos [167] y parece ser impulsado por la alergia al melocotón.

Aunque que el reconocimiento de Lac s 1 fue mayoritario en nuestra población de alérgicos a lechuga (73,8%), el porcentaje de reconocimiento de LTP de melocotón fue aún más alto, alcanzando el 96% de los pacientes y hasta el 87% reconocían más de dos LTP de alimentos incluidos en el microarray ISAC (ThermoFisher). En la mayoría de los casos, los pacientes informaron de reacciones previas con melocotón antes de desarrollar síntomas con lechuga, lo que junto con la probada reactividad cruzada entre la LTP de melocotón y de lechuga [160], sugiere que melocotón actúa como sensibilizante primario en nuestra población de alérgicos a lechuga.

La inmunodominancia de la LTP de melocotón se ha demostrado en pacientes con alergia al cacahuete en España [214] con niveles de frecuencia de reconocimiento más altos de Pru p 3 que Ara h 9 en los pacientes alérgicos a cacahuete y en muchos de esos casos un historial previo de alergia al melocotón. En dicho estudio, los ensayos de inhibición indicaron que Pru p 3 era el sensibilizador primario. En nuestro estudio, la hipótesis de que el melocotón fuera el sensibilizante primario se apoya tanto por la clínica como por la alta frecuencia de sensibilización a Pru p 3, pero se necesitan estudios de inhibición para confirmarlo.

Asero y col con el estudio EpidemAAITO [112] vieron que existían diferencias geográficas en cuanto al alimento responsable que puede ser debido a exposición a pólenes, hábitos dietéticos o bien factores genéticos.

La sensibilización a LTPs en la zona mediterránea es probablemente conducida por la dieta en combinación con la exposición a polen. Como se ha comentado en la introducción, existe una alta RC entre LTPs de diferentes alimentos vegetales [86] [104] [156] [109], tanto con vegetales filogenéticamente relacionados como en aquellos taxonómicamente no relacionados, lo que hace que los pacientes puedan estar sensibilizados a múltiples alimentos [111] (Síndrome de

DISCUSIÓN

LTP). Se postula que puede ser debido a la ubicuidad de las LTPs en el reino vegetal, pero, este amplio reconocimiento parece que puede estar “modulado” por las polinizaciones de la zona, ya que como valoró Palacín [170], zonas como Barcelona y Canarias fueron las regiones donde los más pacientes más reconocían LTPs, coincidiendo que son zonas donde existe polinización de platanero y artemisia. Zonas como Barcelona, Zaragoza o Madrid, donde predomina el polen de platanero o bien Murcia o Canarias, donde predomina el de artemisia, son zonas que concentran más casos de alergia alimentaria y mucho se ha postulado sobre si la LTP pudiera ser la inductora.

De forma concordante con los resultados obtenidos por prueba cutánea, se observó que la mayoría de los pacientes alérgicos a lechuga estaban además sensibilizados a la LTP de polen de plátano (Pla a 3). Scala y colaboradores [169] han demostrado que el reconocimiento de más de 5 moléculas de entre las LTP incluidas en la micromatriz ISAC, y la ausencia de co-sensibilización a proteínas PR-10 y profilinas se asocia significativamente con el riesgo de sufrir reacciones sistémicas. En este sentido algunos autores proponen que en presencia de este perfil se recomiende a los pacientes llevar siempre autoinyector de adrenalina y se les instruya en una dieta de evitación estricta de los alimentos [215]. Desafortunadamente, los primeros ISAC realizados en nuestra población eran la primera plataforma que sólo incluía tres LTP y sólo se pudo demostrarse sensibilización a más de 5 LTP en 4 casos de los 9 analizados con la plataforma 112. Destaca que pese a que los pacientes estudiados estaban polisensibilizados a múltiples alimentos de origen vegetal y pólenes, ninguno estaba sensibilizado a proteínas homólogas de Betv1 y sólo dos pacientes estaban sensibilizados a profilinas. En ambos casos los pacientes estaban sensibilizados a polen de gramíneas y los ensayos de inmunodetección no mostraban reconocimiento de ninguna banda con pesos moleculares entre 14 y 16 kDa en el extracto de lechuga.

En el mismo trabajo de Scala y colaboradores, se describía que los niveles más altos de IgE específica a la LTP de melocotón se asociaban con reacciones más graves. Este dato no se confirma en nuestra población en la que no se pudo demostrar correlación entre una mayor gravedad de los síntomas y los niveles de IgE específica para lechuga, o para Pru p 3 de melocotón. Es posible que esto se deba a que en nuestra población la mayoría de reacciones sistémicas se produjeron en presencia de un cofactor. Así, incluso con niveles bajos de IgE específica a LTP, la presencia concomitante de un cofactor disminuiría el umbral de respuesta y aumentaría la gravedad de la expresión clínica de la reacción [38].

También en este sentido, Uasuf y col [216] comprobaron que la relación entre los niveles de IgE, la gravedad de la reacción y la presencia de síntomas con alimentos que contienen LTP diferente de melocotón, es en el momento actual controvertida.

Respecto a la sensibilización a taumatinas, la plataforma ImmunoCAP ISAC sólo contiene una, la taumatina de kiwi (Act d 2) y, pese a que los estudios de inmunodetección revelaban que el 69% de los pacientes reconocía la taumatina de lechuga, sólo un paciente con sensibilización a taumatina de lechuga demostrada por inmunodetección tuvo un resultado positivo para Act d 2. Parece por tanto que la taumatina de kiwi no sería un buen marcador de sensibilización a taumatinas en nuestra población.

La prueba “patrón oro”, como aconsejan las guías sería la DBPCFC, pero ya se ha comentado la dificultad de enmascaramiento, el riesgo para los pacientes y los costes que presentan. En nuestro estudio cabe destacar que más del 63% de los pacientes se “autoprovocaron” creyendo que la lechuga no podía ser el causante. Cabe destacar que trece pacientes toleraron la ingesta de lechuga sin cofactor, y tres presentan síntomas gastrointestinales. Pascal y col [23] vieron un patrón similar en sus pacientes con síntomas gastrointestinales o SAO que toleraban sin cofactor.

5.2. Caracterización de los alérgenos de lechuga.

Los pacientes incluidos en el estudio constituyen la serie más amplia de pacientes alérgicos a lechuga estudiada hasta el momento, y por lo tanto, el porcentaje de bandas fijadoras de IgE son más representativas de alérgenos mayores.

Mediante la cuantificación de proteínas del extracto de lechuga se confirmó la presencia de una baja cantidad de proteínas en el mismo. Su extracción presentó cierta dificultad por poseer un bajo contenido proteico. En los primeros ensayos realizados se observó que al realizar el SDS-PAGE, el paso de corriente a través del gel durante la electroforesis dio lugar a un patrón proteico distorsionado, este hecho ya fue constatado en el estudio de Vila [178]. Por dicho motivo se realizó posteriormente una cromatografía de filtración en gel que permitió la eliminación de contaminantes y obteniéndose así un extracto enriquecido en proteínas para la correcta detección mediante inmunodetección de bandas que unen IgE.

El análisis del SDS-PAGE del extracto de lechuga mostró múltiples bandas de proteínas con peso molecular (PM) entre 8 y 200 kDa (**Figura 11**).

En los estudios de inmunodetección (Western blot) (**Figura 12**) con pool de sueros de pacientes alérgicos a lechuga se comprobó la capacidad de unión de las IgE séricas de los pacientes frente al extracto de lechuga. Varias bandas fueron reconocidas por más del 50% de los pacientes aunque solo cuatro de ellas pudieron ser identificadas por espectrometría de masas: la de 9, 26, 35 y 45 kDa; la banda de 9 kDa fue reconocida por el 73.8% de los pacientes, la de 26 por el 69% de los pacientes y la de 35 por el 71.4 % de los pacientes.

Las banda de 9 kDa reconocidas por la mezcla de sueros de pacientes alérgicos a lechuga ya había sido identificada y caracterizada como una LTP en estudios previos de alergia a lechuga [160] [167]. Las bandas de 26 y 35-45 kDa ya habían sido reconocidas en estudios previos [176] [177] [178] [167] pero no habían sido identificadas, por lo que procedimos a su caracterización.

5.2.1 Alérgenos descritos en lechuga:

La búsqueda en las bases de datos del programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostró que la proteína de 9 kDa correspondía a una LTP, la de 26 kDa a una taumatina y las de 35 y 45 kDa a una aspartil proteasa.

5.2.1.1. LTP

Hasta el momento de iniciar esta tesis sólo una proteína de 9 kDa había sido aislada e identificada como una proteína transportadora de lípidos, denominada Lac s 1, LTP de lechuga [160] (**Figura 18**).

Respecto a este alérgeno, nuestros resultados confirman los encontrados previamente por otros autores ya que el 73.8% de nuestros pacientes reconocen LTP siendo también alérgeno mayoritario. Además Lac s 1 ha sido un alérgeno mayoritario entre los pacientes que sufrían CEFA, lo que además resultó ser la manifestación clínica más frecuente entre los pacientes con alergia a lechuga de nuestra área.

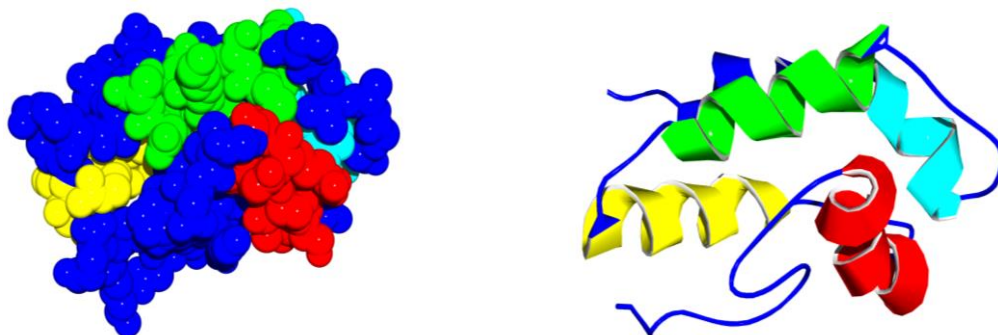


Figura 18. Estructura de LTP de lechuga generada por homología, modelada con la estructura cristalina de Pru p 3 como plantilla (data base entry code 2ALG). El servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>) se usó para crear el modelo 3D model [217] [218] [219] y el programa POV-Ray para mejorar las imágenes.

San Miguel y col [160] caracterizaron Lac s1, en pacientes que sufrieron reacciones sistémicas al comer lechuga. Ya llamaba la atención en ese estudio la alta tasa de anafilaxia en los pacientes, dado que el 50% presentaban dicho síntoma y que además los síntomas del síndrome de alergia oral fueron seguidos por síntomas más severos en la mayoría de los casos. Estos pacientes también tenían síntomas similares al comer melocotón, demostrándose reactividad cruzada con entre Lac s 1 y otras LTPs de pólenes (artemisia) y de frutas rosáceas, encontrándose un 66% de identidad de secuencia de aminoácidos entre ellas. La LTP de lechuga tiene una identidad de secuencia muy alta con otras proteínas de tipo LTP como la de melocotón, manzana, el polen de platanero y el de artemisia y por tanto una alta capacidad de presentar RC [167].

5.2.1.2 Taumatinas

Las bandas de 26 kDa y mayores ya fueron observadas previamente en varios estudios. Escudero y col ya observaron esta proteína de 26 kDa y proteínas de más de 50 kDa y concluyeron que la unión de IgE a estas proteínas se debía a RC frente a determinantes de carbohidratos (CCD) [177]. Hartz [167] concluyó que fue por mala técnica, y San Miguel [160] comprobó que de los 14 pacientes que presentaban síntomas tras la ingesta de lechuga, 10 presentaban una banda de 9 kDa que correspondía a una LTP, pero en 4 de ellos presentaban otras bandas proteicas fijadoras de IgE con un peso molecular superior al de la LTP, o simplemente no presentaban bandas. Los autores justificaron el hecho de no encontrar la LTP en estos pacientes por causa de errores en la técnica y consideraron como marcadores inespecíficos la presencia de otras bandas fijadoras de IgE. En nuestros pacientes el 16.6% no reconocían LTP, pero reconocían taumatina.

DISCUSIÓN

En este estudio demostramos la reactividad cruzada entre las TLPs de lechuga y melocotón. Aunque la TLP de lechuga se describe como alérgeno en nuestro estudio, se usó previamente en estudios de reactividad cruzada entre TLPs, evaluando la reactividad cruzada de éstas. La TLP de lechuga fue incluida junto con otras 15 TLPs de alimentos y pólenes para estudiar su papel en la reactividad cruzada entre frutas y pólenes resultando ser un panalérgeno y describiendo diferentes patrones de reconocimiento de TLP [123].

En nuestro estudio la prevalencia estimada a taumatina es de un 69%, coincidiendo con estudios previos que demostraban una prevalencia de entre el 30-90%. Por el aumento de su prevalencia las taumatinas deberían ser incluidas en estudios de rutina en alergia a frutas y vegetales en el área Mediterránea. Estos datos avalados por Palacín [123] se sustentan en que los individuos afectados de alergia a frutas y pólenes reconocían más frecuentemente TLPs que aquellos que sólo tenían síntomas respiratorios, presentando más del 40% de positividad en los pacientes alérgicos a frutas con valores de más del 50% en áreas como Barcelona, Bilbao, Canarias y Madrid. En el caso de la TLP de platanero era reconocida en los pacientes alérgicos a alimentos en Alicante, Barcelona, Bilbao y Canarias. La TLP de platanero fue la única TLP de polen que parece ser importante en alergia a frutas. Los diferentes patrones de reconocimiento a TLP en las diferentes áreas geográficas estudiadas, sugieren la posible influencia de los pólenes locales en la sensibilización a TLP.

El análisis del perfil de reconocimiento [123] reveló que los alérgicos a alimentos, independientemente de la sensibilización respiratoria, mostraron una respuesta positiva a varias TLPs, a pesar de que esta respuesta tendía a ser más frecuente en pacientes con polinosis. Los patrones de reconocimiento se relacionaron con el área geográfica, sugiriendo un papel del polen en la sensibilización de estos alérgenos. Sólo 6 TLPs, las 2 de melocotón, castaña, lechuga, calabaza y platanero, de las 16 TLP estudiadas mostraron una actividad alérgica reseñable en la población estudiada. El resto, sólo fueron reconocidas por menos del 10%. Curiosamente los pacientes de Barcelona fueron significativamente diferentes, mostrando mayor polisensibilización a estos alérgenos (4 TLP de promedio), respecto a sujetos de otras regiones de España.

En este estudio también se observó que la TLP de melocotón (Pru p 2) parecía ser el punto de partida para la sensibilización a los miembros de esta familia, ya que era capaz de inhibir las bandas fijadoras de IgE de los otros alérgenos testados. En esta tesis, la reactividad cruzada entre las taumatinas de lechuga y melocotón se confirmó por medio de ensayos de inmunoblot y de Elisa inhibición.

Con todo ello, podemos apuntar que en España las LTPs no son las únicas proteínas implicadas en la sensibilización a alimentos vegetales y los miembros de la familia de las taumatinas pueden tener un papel importante, aunque hasta el momento existen pocos estudios de RC entre pólenes y alimentos.

5.2.1.3 Aspartil proteasa

En estudios previos de otros autores [176] [177] [195] se había descrito una reactividad con una proteína de 42-48 kDa que no había sido identificada hasta el momento. Vila [178] apuntó la posibilidad de que la proteína detectada de 50 kDa que observaban en su paciente pudiera coincidir con la proteína de 48 kDa descrita por Cadot [195] y responsable de la reactividad cruzada entre lechuga y achicoria.

En nuestros pacientes el reconocimiento para las bandas de 35 y 45 kDa fue del 71.4% y la secuencia de péptidos tenía una gran homología con proteínas de la familia de las aspartil proteasas.

Las bandas de unión a IgE de 35 y 45 kDa tenían prácticamente el mismo espectro de MS (*fingerprinting*) y la secuencia del péptido más abundante en ambos espectros obtenidos por MS/MS eran idénticos, por lo que podemos deducir que las dos bandas corresponden a la misma proteína. Posiblemente la proteína de 35 kDa es una forma truncada de la proteína de 45 kDa debido a que la mayoría de las aspartil preteasas caracterizadas son sintetizadas con una pre-proteína y después convertidas en enzimas maduras. El papel biológico de estas proteínas se encuentra sin dilucidar, pero su implicación en procesados de proteínas o degradación bajo diferentes condiciones sugiere que las aspartil proteasas son componentes de defensa de las plantas. Algunas proteínas de esta familia han sido descritas como proteínas de defensa en el tomate y la patata [220] [221]. Estas proteínas fueron reconocidas por más del 50% de los pacientes. Ambos probablemente corresponden a la proteína de 42-48 kDa encontrada por otros autores [176] [177] [195], ya que son alérgenos principales. Se sugirió que estas bandas de unión a IgE estaban implicadas en la reactividad cruzada entre la lechuga, la endibia y la achicoria. Los alérgenos pertenecientes a esta familia se han encontrado en extractos de cucaracha (Bla g 2, Per a 2), hongos (Asp p 10, Rhi m AP), almendra (Pru du conglutin), lupino (Lup a gamma conglutin) y *Cryptomera* japónica.

5.2.1.4. Profilina

El grupo de Vila [178] describió una proteína de 16 kDa en el extracto de lechuga que podría corresponder con una profilina, pero no ha sido posteriormente caracterizada como alérgeno

DISCUSIÓN

en la lechuga. Vila sugirió que la banda de 16 kDa correspondería a una profilina y su presencia en lechuga no se había reportado anteriormente ni tampoco se ha reportado posteriormente. Los pacientes que reconocen profilina habitualmente presentan síntomas locales después de ingerir el alimento, pero la paciente descrita por Vila presentó anafilaxia, por lo que no se puede excluir que la clínica sistémica se pudiera deber a otros posibles alérgenos en el extracto.

Nuestros resultados han demostrado que la profilina estaba presente en extractos de lechuga utilizados para estudios inmunológicos (**Figura 17**) pero ninguno de nuestros pacientes estaba sensibilizado a ella. Tanto los resultados de otros estudios como los nuestros señalan que la profilina de lechuga no es un alérgeno significativo entre los pacientes alérgicos a la lechuga.

Una caracterización molecular de los alérgenos alimentarios (sus estructuras tridimensionales, su actividad biológica, su base molecular, etc...) permitirán afinar el diagnóstico de alergia alimentaria, nuevos enfoques terapéuticos, evitar dietas de exclusión estrictas e innecesarias (que pueden provocar déficits nutricionales en el paciente), y ayudar a definir la reactividad cruzada con otras fuentes alergénicas (pólenes o alimentos relacionados) [222] [207].

En la última década, los enfoques en proteómica han proporcionado una poderosa arma para la caracterización de fuentes alergénicas complejas. Nos ha permitido caracterizar 2 proteínas fijadoras de IgE de los extractos de lechuga: una taumatina y una aspartil proteasa, que han resultado ser nuevos alérgenos mayores de lechuga reconocidos por el 69 y el 71.4% de nuestros pacientes, respectivamente. Cabe destacar que el 16.67% de los pacientes alérgicos a lechuga en este estudio fueron sensibilizados a la TLP o la aspartil proteasa pero no a la LTP y por lo tanto, la inclusión de ambos alérgenos en el panel de lechuga probados mejoraría su diagnóstico sensibilidad. La especificidad de estas proteínas fijadoras de IgE de los extractos de lechuga fue comprobada mediante ensayos de inmunoblot inhibición.

Estos datos apoyan la hipótesis que en la alergia a lechuga hay otras proteínas alergénicas implicadas, y además son extractos mayoritarios. El hallazgo de dos nuevos alérgenos mayoritarios en lechuga es importante dado que estas moléculas pueden ser usadas para mejorar la estandarización de los extractos de lechuga, para el diagnóstico *in vivo* o *in vitro* de los pacientes alérgicos a lechuga, para el diagnóstico por componentes, como biomarcadores de enfermedades alérgicas o para futuras inmunoterapias de los pacientes alérgicos a lechuga.

LIMITACIONES:

El objetivo de este estudio fue describir las características clínicas de una muestra de pacientes alérgicos a la lechuga y la descripción de los alérgenos implicados más relevantes por lo que no se incluyó un grupo control. Será necesario realizar un estudio de forma prospectiva y con un grupo control de pacientes con alergia alimentaria sin sensibilización a lechuga para estudiar las características diferenciales de ambos grupos.

Otra de las limitaciones del estudio supone la pérdida de pacientes que no acudieron al seguimiento, lo que hizo que de una muestra inicial de 42 pacientes sobre los que se hizo el estudio molecular de la lechuga, pasamos a 30 pacientes sobre los que se dispusieron de todos los datos para el estudio clínico.

Por último hay que comentar que el número de provocaciones fue escaso y que no se realizaron provocaciones doble ciego y controladas con placebo para confirmar el diagnóstico de alergia a alimentos vegetales o determinar sistemáticamente alergia versus tolerancia a otros alimentos vegetales.

DISCUSIÓN



6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

A partir de los objetivos de nuestro estudio y analizando los resultados obtenidos podemos concluir que:

- 1) La alergia a lechuga en la población de estudio se caracteriza clínicamente por presentar:
 - a. síntomas sistémicos de forma mayoritaria.
 - b. frecuente asociación con cofactores.
 - c. síntomas con otros alimentos vegetales.
 - d. polinosis asociada.

- 2) Los pacientes con alergia a lechuga presentan polisensibilización a pólenes y alimentos
 - a. En el 96.6% de los casos, la alergia a lechuga en nuestra población se presenta en el contexto de un síndrome de LTP.
 - b. Más del 90% presentaban polinosis asociada, principalmente por platanero y artemisia.

- 3) Se han identificado y caracterizado tres alérgenos mayoritarios en el extracto de lechuga, de los cuales:
 - a. La LTP es el alérgeno reconocido de forma mayoritaria (73.8%) por los pacientes.
 - b. Por primera vez se han identificado y caracterizado dos nuevos alérgenos mayoritarios de lechuga, una taumatina y una aspartil proteasa.
 - c. La taumatina de lechuga presenta reactividad cruzada in vitro con la taumatina de melocotón.

ANEXOS

ANEXO 1. Comité Ética



Pg. Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. 93 489 38 91
Fax 93 489 41 02

ID-RTF085

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Doña MIREIA NAVARRO SEBASTIÁN, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón, de Barcelona,

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron , en el cual la Comisión de proyectos de investigación está integrada, se reunió en sesión ordinaria nº 189 el pasado 27/06/2011 y evaluó el proyecto de investigación, con fecha 01/05/2011, titulado "*Perfil de sensibilització i reactivitat creuada entre diferents tipus d'enciams.*" que tiene como investigador principal a la Dra. Sònia Gelis Caparros del Servicio de Medicina Intensiva de nuestro Centro.

Y que tras emitir un informe aprobado condicionado en la reunión 27/05/2011 y evaluar la documentación recibida posteriormente en respuesta a este informe

El resultado de la evaluación fue el siguiente:

APROBADO

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 223/2004, y su composición actual es la siguiente:

Presidenta: Gallego Melcón, Soledad. Médico
Vicepresidente: Bagó Granell, Joan. Médico
Secretaria: Navarro Sebastián, Mireia. Química
Vocales : Armadans Gil, Lluís. Médico
Azpiroz Vidaur, Fernando. Médico



Hospital Universitari Vall d'Hebron
Universitat Autònoma de Barcelona

ANEXO 2. Cuestionario clínico-epidemiológico.

Nº suero:			Siglas	
Hombre/mujer	Edad		Fecha nacimiento/...../.....
			NHC:	

A. FAM.	SI	NO	A. PERS.	SI	NO
Rinitis			Rinitis		
Asma			Asma		
D.atopica			D.atopica		
A.alimentaria			A.alimentaria		

ALIMENTOS		pápula / eritema	Tolerancia	CAP(KU/I)
1	Suero Fisiológico			IgE total:
2	Histamina			
3	Almendra			
4	Avellana			
5	Cacahuete			
6	Nuez			
7	Piñón			
8	Pistacho			
9	Castaña			
10	Pipa girasol			
11	Melón			
12	Kiwi			
13	Manzana			
14	Melocotón piel y pulpa			
15	Melocotón			
16	Plátano			
17	Aguacate			
18	Lechuga			
19	Tomate			
20	Judía verde			
21	Guisante			
22	Lenteja			
23	Cereales			
24	Mostaza			
25	Profilina			
26	LTP			

PÓLENES		CAP(KU/I)
1.	Suero Fisiológico	IgE total:
2.	Histamina	
3.	Bétula	
4.	Cupressus	
5.	Olea europea	
6.	Platanus	
7.	Gramíneas	
8.	Parietaria	
9.	Artemisia	
10.	Plantago	
11.	Chenopodium	
12.	Cynodon	
13.	Phragmites	
14.	Profilina	
15.	LTP	

Prick-prick ALIMENTOS: (niveles de pápula)

	Lechuga		
	Melocotón piel		LTP
	Melocotón pulpa		Profilina

CLÍNICA

Síntomas con LECHUGA							
SAO	Náuseas/ Vómitos	Asma	Anafilaxia				
U	Epigastralgia	RC	CEFA: ejercicio/ OH/ AINEs				
AE	Diarrea		Shock anafiláctico				
UC	Dolor abdominal						
COFACTORES							
Sin Cofactor tolera lechuga?		Clª que presenta ?					
Si	No	SAO	U	AE	AF	epigast	
Aparición síntomas							
Inicio Días/ meses/ años		Última Reacción Días/ meses/ años		Cantidad lechuga bocado ½ ración 1 ración		Tiempo tras ingesta? < 5' 5-30' 30-60' >1h	

Síntomas con MELOCOTÓN					
SAO	U/AE	UC	AF	Asint	No sensib

PROVOCACIONES									
Realizada		Tolerada		Síntomas si no Tolerada					Autoprovocación
Si	No	Si	No	SAO	U	AE	AF	GI	

CLÍNICA CON PÓLENES:

Año de inicio:

	RC	AB		RC	AB		RC	AB
1.- Platanero (Pl)			5.- Gramíneas (G)			9.- Bétula (Be)		
2.- Artemisia (Ar)			6.- phleum (Phl)			10.- Phragmites (Phrg)		
3.- Olea (O)			7.- Cynodon (Cy)			11.- Plantago (Pt)		
4.- Parietaria (P)			8.- Cupressus (Cu)			12.Chenopodium (Ch)		

CLÍNICA CON OTROS VEGETALES:

- ¿Tiene síntomas con los siguientes alimentos?

	SI	¿Cuál? SAO/ U/AE/AF/epigast		SI	¿Cuál? SAO/ U/AE/AF/epigast
Melocotón			Garbanzo		
Manzana			Lenteja		
Pera			Alubia		
Albaricoque			Guisante		
Ciruela			Cacahuete		
Cereza			Soja		
Fresa			Alcachofa		
Nectarina			Endivia		
Fresquilla			Pipa girasol		
Paraguaya			Lechuga		
Níspero			Manzanilla		
Membrillo			Brocoli		
Almendra			Coliflor		
Uva			Mostaza		
Kiwi			Repollo		
Plátano			Acelga		
Aguacate			Espinaca		
Piña			Remolacha		
Castaña			Ajo		
Mango			Cebolla		
Pistacho			Puerro		
Anacardo			Berenjena		
Naranja			Patata		
Mandarina			Pimiento		
Limón			Tomate		
Pomelo			Apio		
Higo			Zanahoria		
Granada			Calabacín		
Chirimoya			Calabaza		
Coco			Pepino		
Avellana			Melón		
Nuez			Sandía		
Sésamo			Piñón		
Maíz					
Trigo					
Cebada					
Centeno					
Avena					
Arroz					

ESTUDIO INMUNOLÓGICO

	kU/L		ISU
IgE total		rPru p 3	
IgEs lechuga			
IgEs Pru p 3 melocotón			
IgEs platanero			
IgEs artemisia			

ISAC:

Alérgeno	ISAC 103	ISAC 112
Pru p 3		
Jug r 3		
Ara h 9		
Cor a 8		
Pla a 3		
Art v 3		
Homólogos Bet v1		
Profilinas		

Bandas que reconoce:

BANDAS					
9	26	35	45	60	66

ANEXO 3.- Trabajos publicados durante la realización de la tesis doctoral

- Identification of thaumatin-like protein and aspartyl protease as new major allergens in lettuce (*lactuca sativa*). **Muñoz-García E**, Luengo Sánchez O, Haroun-Díaz E, Maroto A, Palacín A, Díaz-Perales A, De las Heras Gozalo M, Labrador-Horrillo M, Vivanco F, Cuesta-Herranz J, Pastor-Vargas C. *Mol Nutr Food Res*. 2013 Dec;57(12):2245-52. doi: 10.1002/mnfr.201300139.
- Lettuce allergy is a lipid transfer syndrome-related food allergy with high risk of severe reactions. **Muñoz-García E**, Luengo-Sánchez O, Moreno-Pérez N, Cuesta-Herranz J, Pastor-Vargas C, Cardona V. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016 Sep 9; 27(2):0. doi: 10.18176/jiaci.0110.
- Novel liquid chromatography-mass spectrometry method for sensitive determination of the mustard allergen Sin a 1 in food. Posada-Ayala M, Alvarez-Llamas G, Maroto AS, Maes X, **Muñoz-García E**, Villalba M, Rodriguez R, Pérez-Gordo M, Vivanco F, Pastor-Vargas C, Cuesta-Herranz J. *Food Chem*. 2015 Sep 15;183:58-63. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.139.
- Molecular characterization of contact urticaria in patients with melon allergy. Gandolfo-Cano M, Bartra J, González-Mancebo E, Feo-Brito F, Gómez E, Bartolomé B, **Muñoz-García E**, Sanz Maroto A, Vivanco F, Cuesta-Herranz J, Pastor-Vargas C. *Br J Dermatol*. 2014 Mar;170(3):651-6. *Br J Dermatol*. 2014 Mar;170(3):651-6. doi: 10.1111/bjd.12701.
- Lipid transfer proteins and thaumatins as relevant allergens in melon peel allergy. Gandolfo-Cano M, González-Mancebo E, González-de-Olano D, Mohedano Vicente E, **Muñoz-García E**, Bartolomé B, Pastor Vargas C. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012 Sep;109(3):224-5. doi: 10.1016/j.anai.2012.06.023.
- Allergy to hedgehog with carboxypeptidase and chitinase-like and chymotrypsin-like elastase family members as the relevant allergens. González-de-Olano D, **Muñoz-García E**, Haroun-Díaz E, Bartolomé B, Pastor-Vargas C. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016 Mar;116(3):256-7. doi: 10.1016/j.anai.2015.11.019.

RESEARCH ARTICLE

Identification of thaumatin-like protein and aspartyl protease as new major allergens in lettuce (*Lactuca sativa*)

Esther Muñoz-García^{1*}, Olga Luengo-Sánchez^{2*}, Elisa Haroun-Díaz³, Aroa Sanz Maroto¹, Arancha Palacin⁴, Araceli Díaz-Perales⁴, Manuel de las Heras Gozalo³, Moisés Labrador-Horrillo², Fernando Vivanco^{1,5}, Javier Cuesta-Herranz^{2*} and Carlos Pastor-Vargas^{1*}

¹Department of Immunology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid

²Allergy Section, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona

³Department of Allergy, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid

⁴Center for Plant Biotechnology and Genomic (UPM-INIA), Pozuelo de Alarcón, Madrid

⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Scope: Today, about 2–8% of the population of Western countries exhibits some type of food allergy whose impact ranges from localized symptoms confined to the oral mucosa to severe anaphylactic reactions. Consumed worldwide, lettuce is a Compositae family vegetable that can elicit allergic reactions. To date, however, only one lipid transfer protein has been described in allergic reaction to lettuce. The aim of this study was to identify potential new allergens involved in lettuce allergy.

Methods and results: Sera from 42 Spanish lettuce-allergic patients were obtained from patients recruited at the outpatient clinic. IgE-binding proteins were detected by SDS-PAGE and immunoblotting. Molecular characterization of IgE-binding bands was performed by MS. Thaumatin was purified using the Agilent 3100 OFFGEL system. The IgE-binding bands recognized in the sera of more than 50% of patients were identified as lipid transfer protein (9 kDa), a thaumatin-like protein (26 kDa), and an aspartyl protease (35 and 45 kDa). ELISA inhibition studies were performed to confirm the IgE reactivity of the purified allergen.

Conclusion: Two new major lettuce allergens—a thaumatin-like protein and an aspartyl protease—have been identified and characterized. These allergens may be used to improve both diagnosis and treatment of lettuce-allergic patients.

Keywords:

Allergens / Aspartyl protease / Food allergy / Lettuce allergy / Thaumatin-like protein



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Correspondence: Dr. Carlos Pastor Vargas, Department of Immunology, Hospital Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain
E-mail: cpastor@fjd.es
Fax: +34-915448246

Abbreviations: CEFA, cofactor-enhanced food allergy; LTP, lipid transfer protein; MW, molecular weight; PBS-T, PBS containing 0.1% Tween-20; RT, room temperature; TLP, thaumatin-like protein

1 Introduction

The prevalence of food allergies has been increasing over the last 10 years. Up to 6% of young children and 3–4% of adults have adverse immune reactions to food, and this tendency has increased in recent years [1]. Among food allergens, plant-derived foods are a major cause of food allergy during adulthood in Mediterranean countries [2].

Although a large number of plant-derived food allergens have been characterized, most of them belong to a limited

*These authors contributed equally to this work.

number of protein families. Classifying allergens into protein families can help answering questions such as which allergens might be cross-reactive [3, 4].

Lettuce (*Lactuca sativa*), which belongs to the Compositae family, is a widely consumed vegetable in the Mediterranean area. Vegetables such as endive, escarole, artichoke, chicory and chard, as well as pollens such as mugwort, ragweed, and taraxacum are also included in this large plant family. Cross-reactivity between members of this family has been described [5]. Despite being a common dietary component worldwide—and more so in Mediterranean areas—few reports on lettuce allergy have been published to date [6–13]. However, in the last year it has been reported as a frequent cause of food allergy among patients suffering from cofactor-enhanced food allergy (CEFA) [14] and the so-called lipid transfer protein (LTP) syndrome [15].

With regard to lettuce-allergen characterization, several IgE-binding bands have been detected in the lettuce extract, but only one 9 kDa protein has been isolated and identified as a LTP. In 2003, San Miguel-Moncin et al. characterized the protein, naming it Lac s 1, a major allergen among patients with systemic reactions to lettuce [11]. It was later proved that Lac s 1 cross-reacted with other LTPs; it has an amino acid identity of 66% to Pru p 3, and 72% to the N-terminal peptide of plane tree pollen LTP, Pla a 3 [12].

In 1998, Vila et al. [9] described a 16 kDa protein in the lettuce extract that could correspond to a profilin but which has not been characterized subsequently as a lettuce allergen. Patients who had specific IgE to this 16 kDa protein developed local symptoms after eating lettuce. In the same study, three other IgE-binding proteins were found in the lettuce extract, with molecular weights (MWs) of about 50, 43, and 39 kDa, but they were not further identified. A 42–48 kDa IgE-binding band was also described by other authors [7, 8, 16], and Cadot et al. suggested it could be responsible for cross-reactivity between lettuce, endive, and chicory.

The aim of the study was to characterize new major allergens in lettuce extracts based on the study of a large sample of lettuce-allergic patients combined with a proteomic approach. In our study, we identified and characterized two major lettuce allergens, a 26 kDa protein which was found to be a member of the thaumatin-like family, and two proteins of MW around 35 and 45 kDa, which belong to the aspartyl protease family.

2 Materials and methods

2.1 Patient sera

Sera from 42 patients allergic to lettuce were selected from Hospital Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) and Fundación Jiménez Díaz Hospital (Madrid, Spain). Lettuce allergy (inclusion criteria) was diagnosed in patients having a clear history of adverse reactions suggestive of IgE-mediated allergy, along with positive skin prick test and/or food challenge test, in ac-

cordance with the diagnostic algorithm described by Ibanez et al. [17]. Patients experiencing severe systemic reactions to lettuce, as well as patients with typical, recent, repeated, and unequivocal reactions, who had positive skin tests, did not undergo an oral challenge test to diagnose lettuce allergy. A panel of aeroallergens and plant food was tested in all patients in skin prick test (see Supporting Information Table 1). CEFA patients were diagnosed according to the algorithm proposed by Cardona et al. [14]. The protocol was approved by the Hospital Ethic Committee and patients provided informed consent to be included in the study.

2.2 Preparation of lettuce extracts

Lettuce extract was prepared from *L. sativa* L. var. *longifolia* and carried out as previously described [13] with some modifications. Briefly, 200 g of lettuce was homogenized in 100 mL of acetone at -60°C and stored overnight at -80°C . The sample was centrifuged at $4500 \times g$ for 15 min at 4°C . The pellet was then washed three times with acetone at -60°C , lyophilized, dissolved in PBS and extracted overnight at 4°C under constant magnetic stirring. After centrifugation at $14\,000 \times g$ for 45 min at 4°C , the supernatant was dialyzed against NH_4HCO_3 0.1 M, lyophilized and dissolved in PBS. For *in vitro* experiments, the protein concentration of lettuce extracts was adjusted to 1 mg/mL.

2.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE was carried out according to Laemmli [18] using the Hoefer SE 600 electrophoresis system (GE Healthcare). Polyacrylamide concentrations of 14% w/v and 5% w/v were used for separating and stacking gels, respectively. A total of 20 μg of protein extract and 5 μg of purified protein were applied per lane. The samples were mixed with 0.1 M Tris, pH 6.8, containing 4% w/v SDS, 20% w/v glycerol, 10% w/v 2 β -mercaptoethanol, and 0.02% w/v bromophenol blue (under reducing conditions). To ensure proper protein separation and visualization, the gels were stained with PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas International, Inc., Canada) or used for immunoblotting as described below.

2.4 Immunoblot analysis

Protein bands separated by SDS-PAGE were transferred by semidry blotting onto nitrocellulose sheets according to the method used by Towbin et al. [19]. Membranes were blocked with PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-T), 3% skimmed milk powder, and 3% BSA for 2 h at room temperature (RT) and incubated overnight at 4°C with sera diluted 1:10 in 50 mM Tris buffered saline, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.05% Triton X-100, pH 8.8. After washing them five times with PBS-T, the blots were incubated for

1 h at RT with goat antihuman IgE antibody conjugated with horseradish peroxidase (Nordic, Culhek) diluted 1:5000 in PBS containing 0.05% Tween-20 and 1.5% skimmed milk powder. Finally, after five washings with PBS-T, the protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare) following the instructions provided by the manufacturer. Immunoblot assays were performed with the 42 individual sera from lettuce-allergic patients. In addition, sera from five lettuce-allergic patients were used as a positive serum pool. The criteria for inclusion of patients in the serum pool were (i) high level of specific IgE to lettuce, (ii) serum availability, and (iii) lettuce-allergic patients with no peach allergy. Sera from five nonatopic patients were used as negative controls. For immunoblot inhibition assays, sera from allergic patients were preincubated for 4 h at RT with 100 µg of the inhibitor per milliliter of serum.

2.5 Protein identification and characterization by MS

Protein bands recognized by the sera of more than 50% of patients were selected for further study, and bands were extracted from the gel as previously described [20]. Proteins were identified by MS using LC-MS/MS, as previously described [21], in the Proteomic Service of the Complutense University of Madrid, a member of the ProteoRed Network.

2.6 Purification of native thaumatin-like protein (TLP)

Lettuce thaumatin was purified using the Agilent OffGel 3100 system. Briefly, isoelectric point-based protein separation was performed on the 3100 OFFGEL Fractionator and the OFFGEL Kit pH 4–7 (both Agilent Technologies) with a 12-well setup according to the protocol of the supplier. Fifteen minutes prior to sample loading, IPI gel strips with a linear pH gradient ranging from 4 to 7 were rehydrated in the assembled device with 0.7 mL of focusing buffer per well. A total of 1 mg of the lettuce extract was diluted in focusing buffer to a final volume of 1.8 mL, and 150 µL of sample was loaded in each well. The sample was focused with a maximum current of 50 µA. The experimental isoelectric point of lettuce thaumatin was around 5.50–6.00. Peach thaumatin was purified as previously described by Palacin et al. [22].

2.7 ELISA and ELISA inhibition studies

For ELISA and ELISA inhibition assays, 96-well flat-bottom plates were used (Immunolon 4HBX, Thermo). The plates were coated in duplicate overnight at 4°C with 1 µg per well of lettuce extract diluted in coating buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6). The plates were blocked with PBS containing 0.05% Tween-20 and 2% BSA for 1 h at RT. After blocking, the plates were washed three times with PBS

containing 0.05% Tween-20. The plates were then incubated for 2 h at RT with patients' sera diluted 1:10 in blocking buffer. The plates were washed again and incubated with the secondary antibody (goat antihuman IgE-peroxidase, Nordic, Culhek) diluted 1:5000 with 2% BSA and 0.05% PBS-T for 1 h at RT. IgE reactivity was detected by adding 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Chemicon) and measured at 620 nm. Sera from five nonatopic patients were used as negative controls. IgE reactivity was considered positive when a patient's OD at 620 nm was two times higher than a negative control's OD at the same absorbance. All tests were performed in duplicate. For ELISA inhibition assays, sera from allergic patients were preincubated for 4 h at RT with dilutions ranging from 100 to 0.001 µg of the inhibitor (purified protein) per milliliter of serum.

3 Results

3.1 Clinical features of lettuce-allergic patients

Characteristics of the patients included in the study are shown in Table 1. The median age of patients was 34 years (range 16–60) with a gender distribution of 14/42 males (33.33%) and 28/42 females (66.66%). The most frequent clinical symptom was co-factor-enhanced anaphylaxis (20/42, 47.61% of patients), followed by anaphylaxis (9/42, 21.42%), oral allergy syndrome (7/42, 16.66%), and urticaria (5/42, 11.9%).

In Table 1, sensitizations to pollens and plant foods are shown. Forty-seven patients had also concomitant pollen sensitization, mainly to *Platanus acerifolia*, *Artemisia vulgaris*, grass pollen mixture, and olive pollen. Most patients were sensitized to other plant-derived foods, mainly rosaceae fruits (80.95%) and nuts (73.8%).

3.2 SDS-PAGE and immunoblotting

SDS-PAGE of lettuce extract showed multiple protein bands with an apparent MW ranging from 8 to 115 kDa (Fig. 1). Figure 2 shows the binding of specific IgE in the sera of 42 lettuce-sensitized patients. The most frequently recognized allergens had MWs around 9, 26, 35, 45, 55, and 66 kDa (Fig. 2), detected by the sera of more than 50% of the patients. The frequency of recognition of protein bands is shown in Table 2. Control immunoblot assays with the pooled serum from nonatopic patients did not show any IgE-binding bands. Specificity of IgE-binding bands was proved by immunoblotting inhibition after preincubation with lettuce extracts (see Supporting Information Fig. 1).

3.3 Protein identification and characterization by MS

To identify the IgE binding proteins, we performed MS/MS and obtained the sequence of several internal peptides (Table 2). Protein identification was performed by searching

Table 1. Clinical features of lettuce-allergic patients

Patient	Age	Sex	Symptoms	CEFA symptoms/ cofactor	Aeroallergens sensitization	Sensitization to other foods
1	35	F	U/AE		Ar, Cu, G, Me, O, P, Phr, Pl, Ptg	Ce, Fi, L, Me, N, Pe, Ro
2	43	M	CEFA	AF/NSAIDs	PI	Be, L, Ro
3	31	F	AF		Ar, G, PI	N, Ro, To
4	24	F	AF		Ar, PI	L, N
5	44	M	U/AE		Ar, G, O, PI	Be, N, Ro
6	29	F	OAS		Ar, O, PI, Ptg	Ki, L, Mu, N, On, Pe, Ro, To
7	30	F	CEFA	AF/NSAIDs-exercise	PI	Ki, N, Ro
8	56	M	CEFA	AF/Alcohol	Ar, PI	L, N, Ro
9	39	F	AF		Ar, PI	Ce, L, N, Ro
10	44	M	OAS		Ar, P, PI	N, Ro
11	39	M	AF		-	L, N, Ro, To
12	29	F	OAS		Ar, PI	Ce, Mu, N, Ro, To
13	38	F	U/AE		Ar, P, PI	Ki, N, Ro
14	23	F	CEFA	AF shock/exercise	Ar, PI	N, Ro, To
15	40	F	CEFA	AF/NSAIDs	Ar, G, P, PI, Sa	Gra, Me, Mu, N, Ro
16	37	F	U/AE		Ar, Cu, G, Me, O, P, Ptg, Phr, PI	Ce, L, Me, N, Pe Ro
17	22	F	OAS		PI	N, Ro, To
18	34	F	CEFA	AF/Alcohol-NSAIDs	Cu, O, PI	Ce
19	37	F	OAS		Ar, PI	Av, L, Me, N, Ro
20	19	F	AF		Cu, G, Phrg, PI, Ptg	Av, Ce, L, Mu, N, Ro
21	34	M	CEFA	AF/Exercise	Ar, G, P	Ce, N, Ro
22	21	F	CEFA	AF/Exercise	Ar, PI	Ki, N, Ro
23	42	F	CEFA	AF/Exercise	-	Ro
24	60	F	CEFA	AF/Alcohol-NSAIDs	P	Me, N, Pe, Ro
25	29	F	AF		PI	Ba, Be, Gra, Ro, To
26	24	M	OAS		Ar, P, PI	N, Ro
27	34	M	CEFA	AF/NSAIDs	Cyn, G, O, phrg	-
28	45	M	CEFA	AF/NSAIDs	Ar, G, O, PI, ptg	N, Ro
29	41	F	CEFA	AF/NSAIDs	Ar, PI	Me, N, Ro
30	22	F	CEFA	AF/Exercise	G	N, Ro
31	45	M	CEFA	AF/NSAIDs	PI	L, N, Ro, To
32	25	F	CEFA	AF/Exercise	Ar, G, O, P	Ba, Mu, N
33	30	M	CEFA	AF/ NSAIDs-exercise	Ar, Cu, G, O, PI	N, Ro
34	32	M	AF		G, O, PI, Ar, tx, be	-
35	25	F	OAS		PI, G, O, Sa	Av, Fi, Me, Ro
36	29	F	AF		PI, G, O	-
37	39	F	AF		PI, G, Cu	Ki, Pr, Ro, Str
38	43	M	U/AE		PI, G, Cu, O, Sa, ptg	Ki, Me, Ro, Wa
39	55	M	VO		G, Sa	Av, Ki, Ma, Me, Wa
40	33	F	CEFA	AF/Exercise	PI, Ar	L, Mu, N, Ro
41	16	F	CEFA	AF/Exercise	PI, O, P, cyn, phag, Me	Be, Ce, Mu, N, To
42	23	F	CEFA	AF/Exercise	PI	Ce, Gra, Me, N, Ro

M: male, F: female. Symptoms: AF: anaphylaxis; CEFA: co-factor-enhanced food allergy; OAS: oral allergy syndrome; U: urticaria; AE: angioedema; VO: vomiting. Cofactors: NSAIDs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Aeroallergen sensitization: A: Artemisia; Be: Betula; Cu: Cupressus; Cyn: Cynodon; G: grass mix; Me: mercurialis; O: Olea; P: Parietaria; PI: plane tree; Ptg: Plantago; Phr: Phragmites; Sa: Salsola; Tx: Taraxacum. Foods: Av: avocado; Ba: banana; Be: green bean; Ce: carrot; Ce: cereals; Fi: fig; Gra: grape; Ki: kiwi; L: legume; Ma: mango; Ma: melon; Mu: mustard; N: nuts; On: onion; Pe: green pepper; Pi: pineapple; Pr: pear; Ro: Rosaceae fruits; Str: strawberry; To: tomato; Wa: watermelon.

a nonredundant protein sequence database (NCBI) using the Mascot program (<http://www.matrixscience.com>). Research conducted with protein databases led to the identification of the 9 kDa protein band as a LTP. The peptide sequences of the 26 kDa protein yielded a high match with TLP from related species such as *Sambucus nigra*, *Isatis tinctoria* and *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*. Match found between sequence of internal peptides of lettuce TLP and related TLP species was 100%. For 35 and 45 kDa IgE-binding band, peptide

sequences exhibited a high degree of homology with proteins from the aspartyl protease protein family. No significant homologies were found for 55 and 66 kDa IgE-binding proteins.

3.4 Purification of the allergenic TLP from lettuce

The purified lettuce 26 kDa protein was analyzed by means of MS/MS and identified as being a TLP according to the

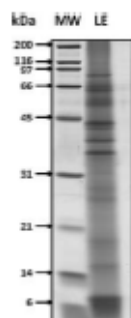


Figure 1. SDS-PAGE of lettuce extract under reducing conditions. MW: molecular weight. LE: lettuce extract.

sequence of internal peptides obtained. Peptides identified from purified lettuce thaumatin were the same as those previously identified together with an additional peptide (ASTMSCPGGTNYR) probably due to the higher purity of the purified TLP. The IgE-binding activity of the purified lettuce thaumatin was maintained throughout the whole process, as confirmed by immunoblots performed with a serum pool from lettuce-allergic patients (Fig. 3). To prove that its IgE-binding activity was the same as the natural thaumatin contained in the whole extract, ELISA inhibition assays were performed using lettuce extract in solid phase with a pool of sera recognizing the TLP in the immunoblotting studies. Purified thaumatin inhibited the IgE-binding capacity from pooled sera of lettuce-allergic patients in a dose-dependent manner, with the highest inhibition (37%) observed at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of inhibitor concentration (Fig. 4). No inhibitory effect was detected in the control experiment using nonatopic pool serum.

3.5 Cross-reactivity between lettuce and peach TLP

In order to study cross-reactivity between lettuce thaumatin and peach thaumatin, we performed immunoblotting using a purified peach TLP, Pru p 2.1, with serum pool from five lettuce-allergic patients not allergic to peach (Fig. 5). Peach thaumatin was recognized by the serum pool. To demonstrate cross-reactivity with lettuce thaumatin, immunoblot inhibition assays were performed using thaumatin in solid phase. Preabsorption of pool sera with lettuce extract and purified lettuce thaumatin resulted in complete inhibition of IgE binding (Fig. 5).

4 Discussion

In this article, we characterize two new lettuce allergens for the first time, which were shown to be two new major let-

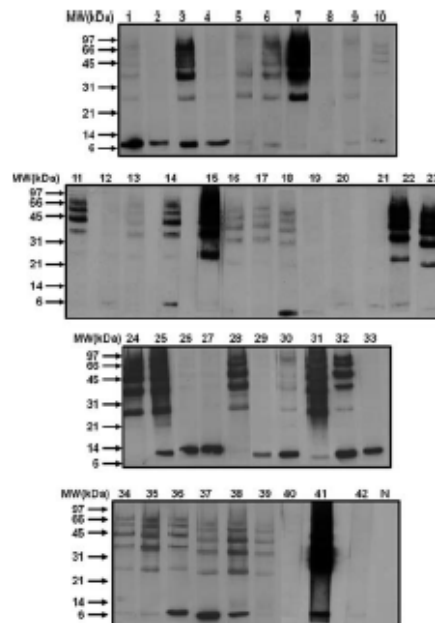


Figure 2. IgE-binding bands in lettuce extract by immunoblotting. Lanes 1 through 42 represent serum from 42 patients. Lane N represents a negative control of serum pool from nonatopic patients. MW: molecular weight markers (kDa).

tuce allergens: a TLP and an aspartyl protease. These findings are significant because these molecules can be used to improve standardization of lettuce extracts for in vivo or in vitro diagnosis, component-resolved diagnosis, biomarkers of allergy diseases, or future immunotherapy treatment of lettuce-allergic patients.

We have reached these conclusions by combining clinical and immunological studies as well as MS analysis. We believe some aspects of our findings are especially noteworthy. The first characteristic of note is seen in the clinical aspect of the study, considering both the inclusion criteria and the number of patients. On analyzing our patients, the most frequent allergic reactions to lettuce were CEFA reactions, which were diagnosed following the diagnostic algorithm previously reported by Cardona et al. [14]. In addition, patients included in this study constituted the largest series of lettuce-allergic patients assembled to date, thus making the percentage of IgE-binding bands more representative of major allergens than previous studies of its kind.

Lac s 1, the lettuce LTP, is the only allergen to be identified so far [11], and our findings are in agreement with it is a

Table 2. Analyzed IgE-binding protein bands from lettuce extract

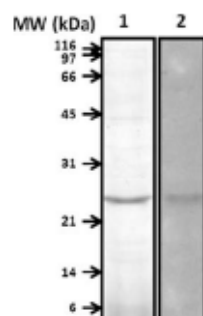
Estimated molecular weight by SDS-PAGE (kDa)	% Recognition of patients	Peptides	Identification
9	31/42 → 73.8%	NGGTPPQPCCTGVR	Lipid transfer protein
26	29/42 → 69%	TNCNFDASGR	Thaumatin-like protein
		APGGCNPCTVFPR	
35	30/42 → 71.4%	AFDNPTGGGTLDSGTVFTR	Aspartyl protease family protein
		TTGSSIPPKGVLGIGR	
45	30/42 → 71.4%	AFDNPTGGGTLDSGTVFTR	Aspartyl protease family protein
		LVDGAYTAVRDEFR	
		VLFDLPNSR	
55	27/42 → 64.3%	SSLSDILSR	No significant identity
66	27/42 → 64.3%	EELLTPYVSKNPR	No significant identity
		LAVIIGFR	

Percentage of recognition by sera from lettuce-allergic patients in immunoblotting and identification of proteins by MS/MS.

major lettuce allergen, recognized by the 73% of our patients. In addition to that, our results found that Lac s 1 is also a major allergen among patients experiencing CEFA reactions, and this was shown to be the most frequent manifestation of lettuce allergy in our area.

Over the last decade, proteomic approaches have proved to be a powerful tool for molecular characterization of complex allergen sources. As a tool, it has allowed us to characterize two IgE-binding proteins from lettuce extracts: a TLP and an aspartyl protease, which were revealed to be new major lettuce allergens, recognized by the 69 and 71% of our patients, respectively. Noteworthy, 7/42 (16.67%) of the lettuce allergic patients in this study were sensitized either to the TLP or the aspartyl protease but not to LTP and thus, the inclusion of both allergens in the panel of lettuce allergens tested would improve its diagnostic sensitivity. The specificity of these IgE-binding bands from lettuce extracts was checked by immunoblotting inhibition assays.

Proteins of the thaumatin-like family have molecular masses of 20–30 kDa, with a very stable 3D structure that is maintained by six disulphide bridges. They have been described as plant defense proteins (PR-5) against pathogen attacks, especially of the fungal sort, and are generally resistant to proteases and pH or heat-induced denaturation. TLPs are panallergens and may be responsible for cross-reactivity between foods and pollen [23]. Several allergenic TLPs have been described in fruits, including peach (Pru p 2) [22], apple (Mal d 2) [24], sweet cherry (Pru a 2) [25], bell pepper [26], kiwi [27], grape [28], and in pollens such as cypress [29], olive [30], and plane tree [31]. Also, some TLPs have been described as glycoproteins and the presence of carbohydrates determinant for their allergenic capacity [32]. Although lettuce TLP is reported as an allergen in the present study, we used it in studies of cross-reactivity of TLPs. Indeed, in a recent study by Palacin et al. [31] evaluating the cross-reactivity of TLP, lettuce TLP was included along with 15 other TLPs from foods and pollens so as to study their role in cross-reactivity between fruits and pollens. The study reported TLPs are panaller-

**Figure 3.** Purified lettuce thaumatin. Lane 1: SDS-PAGE analysis of purified protein under reducing conditions. Lane 2: Immunoblot analysis of purified protein under reducing conditions with a serum pool from lettuce-allergic patients.

gens and described different patterns of TLP recognition. In the present study, cross-reactivity between lettuce and peach TLP was confirmed by immunoblot and ELISA-inhibition experiments.

Interestingly, the 35 and 45 kDa IgE-binding bands had virtually the same MS spectrum (fingerprinting) and the sequence of the most abundant peptide in both spectra obtained by MS/MS was identical. Thus, these two bands correspond to the same protein, as the 35 kDa protein is a truncated form of the 45 kDa protein because the majority of plant aspartic proteinases characterized are synthesized with a prepro-protein and subsequently converted to mature enzymes. The biological role of plant aspartyl proteases is not completely established, but their involvement in protein processing or degradation under different conditions suggests aspartic proteinases are components of the plant defense response. Some proteins from this family have been reported to be defense proteins in tomato and potato [33, 34]. These proteins

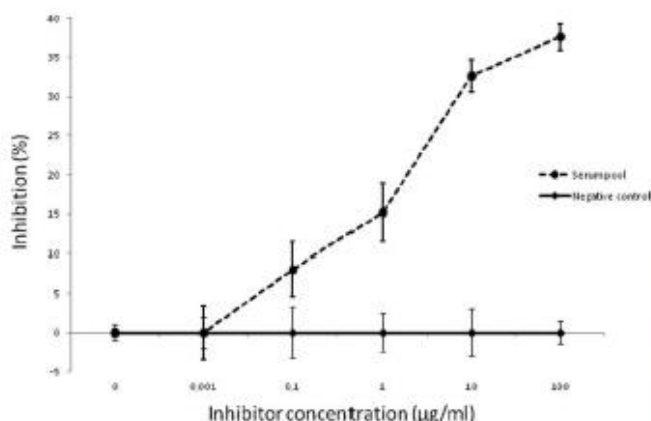


Figure 4. ELISA inhibition assay. Lettuce extract (10 µg) was used as solid phase and serum pool was preincubated with increasing concentrations of purified lettuce thaumatin (dotted line). Serum pool from nonatopic patients preincubated with increasing concentrations of purified lettuce thaumatin as negative control (solid line). All tests were performed in duplicate.

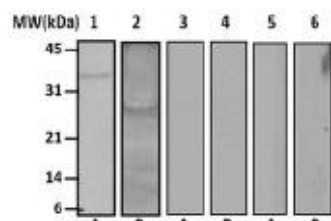


Figure 5. Immunoblot analysis of purified thaumatin (1 µg) with a serum pool from lettuce-allergic patients with no peach allergy. (A) Pru p 2 in solid phase. (B) Lettuce thaumatin in solid phase. Lanes 1 and 2: without preincubation. Lanes 3 and 4: preincubation with lettuce extract. Lanes 5 and 6: preincubation with purified lettuce thaumatin.

were recognized by the sera of more than 50% of patients and identified as proteins belonging to the aspartyl protease family. Both probably correspond to the 42–48 kDa protein found by other authors [7, 8, 16], since they are major allergens. It has been suggested that these IgE-binding bands are involved in the cross-reactivity between lettuce, endive, and chicory. Allergens belonging to this family have been found in extracts from cockroach (Bla g 2, Per a 2), fungi (Asp p 10, Rhi m AP), almond (Pru du conglutin), lupin (Lup a gamma conglutin), and *Cryptomer japonica* (www.allergome.org).

In addition to LTP, profilin has been reported to be a frequent allergen involved in plant food allergic patients from Spain [35]. Based on this, Vila et al. suggested that profilin was an allergen [9]. Our results have found that profilin was present in lettuce extracts used for immunological studies (see Supporting Information Fig. 2), but none of our patients was sensitized to profilin. Although it cannot be ruled out that

some patient might be sensitized to profilin, the results from other studies and ours both indicate that lettuce profilin is not a significant allergen among lettuce-allergic patients. In summary, we have identified and characterized two new major lettuce allergens—a TLP and an aspartyl protease—which may be used to improve the diagnosis and future treatment of lettuce-allergic patients.

The RETIC Red de Investigación de Reacciones Adversas a Alérgenos y Fármacos (RD12/0013/0013) and Fondo de Investigación Sanitaria (P110/00974) supported this study. We thank Oliver Shaw for his assistance in editing the English version.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Wang, J., Sampson, H. A., Food allergy. *J. Clin. Invest.* 2011, 121, 827–835.
- [2] Asero, R., Antonicecchi, L., Arena, A., Bommarito, L. et al., Epidemiology: features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study. *Clin. Exp. Allergy* 2009, 39, 547–555.
- [3] Herrer, A., Egger, M., Gadermaier, G., Erler, A. et al., Characterization of plant food allergens: an overview on physicochemical and immunological techniques. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, 93–112.
- [4] Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A. et al., Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008, 121, 847–852.
- [5] Garcia Ortiz, J. C., Cosmes, P. M., Lopez-Asunsolo, A., Allergy to foods in patients monosensitized to *Artemisia* pollen. *Allergy* 1996, 51, 927–931.

- [6] Hebling, A., Schwartz, H. J., Lopez, M., Lehrer, S. B., Lettuce and carrot allergy: are they related? *Allergy Proc.* 1994, 15, 33–38.
- [7] Franck, P., Kanny, G., Dousset, B., Nabet, P. et al., Lettuce allergy. *Allergy* 2000, 55, 201–202.
- [8] Escudero, A., Bartolomé, B., Sánchez-Guerrero, I. M., Palacios, R., Lettuce and chicory sensitization. *Allergy* 1999, 54, 183–184.
- [9] Vila, L., Sánchez, G., Sanz, M. L., Dieguez, I. et al., Study of a case of hypersensitivity to lettuce (*Lactuca sativa*). *Clin. Exp. Allergy* 1998, 28, 1031–1035.
- [10] Olive-Perez, A., Pineda, F., Anaphylactic reaction to 'Tudela' lettuce hearts. *Allergy* 2003, 58, 1205–1206.
- [11] San Miguel-Moncin, M., Krail, M., Scheurer, S., Enrique, E. et al., Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy* 2003, 58, 511–517.
- [12] Hartz, C., San Miguel-Moncin, M. M., Cistero-Bahima, A., Fotisch, K. et al., Molecular characterization of Lac s 1, the major allergen from lettuce (*Lactuca sativa*). *Mol. Immunol.* 2007, 44, 2820–2830.
- [13] Bascones, O., Rodríguez-Pérez, R., Justo, S., Monzo, I. et al., Lettuce-induced anaphylaxis. Identification of the allergen involved. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 2009, 19, 154–157.
- [14] Cardona, V., Luengo, O., Garriga, T., Labrador-Horrillo, M. et al., Co-factor-enhanced food allergy. *Allergy* 2012, 67, 1316–1318.
- [15] Pascal, M., Muñoz-Cano, R., Reina, Z., Palacin, A. et al., Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin. Exp. Allergy* 2012, 42, 1529–1539.
- [16] Cadot, P., Kochuyt, A. M., Deman, R., Stevens, E. A., Inhalative occupational and ingestive immediate-type allergy caused by chicory (*Cichorium intybus*). *Clin. Exp. Allergy* 1996, 26, 940–944.
- [17] Ibanez, M. D., Alonso, E., Blanco, C., Cistero, A., et al., Metodología diagnóstica en la alergia a alimentos. *Alergol. Immunol. Clin.* 1999, 14, 50–62.
- [18] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680–685.
- [19] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 4350–4354.
- [20] Cuesta-Herranz, J., Pastor, C., Figueredo, E., Vidarte, L. et al., Identification of Cucumisin (Cuc m 1), a subtilisin-like endopeptidase, as the major allergen of melon fruit. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33, 827–833.
- [21] Pastor, C., Cuesta-Herranz, J., Cases, B., Pérez-Gordo, M. et al., Identification of major allergens in watermelon. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2009, 149, 291–298.
- [22] Palacin, A., Tordesillas, L., Gamboa, P., Sánchez-Monge, R. et al., Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clin. Exp. Allergy* 2010, 40, 1422–1430.
- [23] Breiteneder, H., Thaumatin-like proteins – a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* 2004, 59, 479–481.
- [24] Oberhuber, C., Ma, Y., Marsh, J., Rigby, N. et al., Purification and characterisation of relevant natural and recombinant apple allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, 52, S208–S219.
- [25] Inschlag, C., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordan, G., Ahorn, H. et al., Biochemical characterization of Pru a 2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*). *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1998, 116, 22–28.
- [26] Jensen-Jarolim, E., Santner, B., Leitner, A., Grimm, R. et al., Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1998, 116, 103–109.
- [27] Gavrovic-Jankulovic, M., Clrkovic, T., Vuckovic, O., Atanaskovic-Markovic, M. et al., Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002, 110, 805–810.
- [28] Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C. et al., Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003, 111, 350–359.
- [29] Cortegano, I., Civantos, E., Aceituno, E., del Moral, A. et al., Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy* 2004, 59, 485–490.
- [30] Palomares, O., Alcantara, M., Quiralta, J., Villalba, M. et al., Airway disease and thaumatin-like protein in an olive-oil mill worker. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358, 1306–1308.
- [31] Palacin, A., Rivas, L. A., Gómez-Casado, C., Aguirre, J. et al., The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: a multicenter study using a specific protein microarray. *PLoS One* 2012, 7, e44088.
- [32] Palacin, A., Quiroga, S., Sánchez-Monge, R., Fernández-Nieto, M. et al., Allergy to kiwi in patients with baker's asthma: identification of potential cross-reactive allergens. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2008, 101, 200–205.
- [33] Schaller, A., Ryan, C. A., Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Mol. Biol.* 1996, 31, 1073–1077.
- [34] Guevara, M. G., Almeida, C., Mendieta, J. R., Faro, C. J. et al., Molecular cloning of a potato leaf cDNA encoding an aspartic protease (StAsp) and its expression after *P. infestans* infection. *Plant Physiol. Biochem.* 2005, 43, 882–889.
- [35] Cuesta-Herranz, J., Barber, D., Blanco, C., Cistero-Bahima, A. et al., Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2010, 153, 182–192.

Lettuce Allergy Is a Lipid Transfer Syndrome-Related Food Allergy With a High Risk of Severe Reactions

Muñoz-García E^{1,2,3}, Luengo-Sánchez O^{1,4}, Moreno-Pérez N^{1,4},
Cuesta-Herranz J⁵, Pastor-Vargas C^{2*}, Cardona V^{1,4*}

¹Allergy Section, Department of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

²Department of Immunology, IIS- Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

³Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain

⁴Allergy Research Unit, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁵Department of Allergy, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

*These authors contributed equally to this work

J Invest Allergol Clin Immunol 2017; Vol. 27(2): 98-103
doi: 10.18176/jiaci.0110

■ Abstract

Background and Objectives: Lipid transfer protein (LTP) sensitization is the most common cause of food allergy in the Mediterranean area, with peach allergy acting as the primary sensitizer in most cases. Lettuce has been described as a common offending food in patients with LTP syndrome. The aim of the study was to investigate the frequency and clinical expression of LTP syndrome in a sample of lettuce-allergic patients.

Methods: We determined specific IgE to Pru p 3 and lettuce in a sample of 30 patients with a diagnosis of lettuce allergy. Symptoms elicited by other LTP-containing plant-derived foods and the presence of cofactors were assessed.

Results: The clinical symptoms of lettuce allergy were frequently severe, with 18 of the 30 patients experiencing anaphylaxis. All the patients had allergic reactions to other plant foods. Cofactors were involved in the clinical reactions of 13 of the 30 patients. Sensitization to pollens was found in 90% of patients.

Conclusions: Lettuce allergy is found not as an isolated condition but in the context of LTP syndrome and it is characterized by severe reactions and frequent cofactor association.

Key words: Anaphylaxis. Cofactor. Food allergy. Lettuce allergy. Lipid transfer protein. LTP syndrome.

■ Resumen

Introducción y Objetivo: La sensibilización a la LTP es la causa más frecuente de alergia alimentaria en el área mediterránea, siendo la alergia al melocotón el sensibilizador primario en la mayoría de los casos. La alergia a la lechuga ha sido descrita como una manifestación frecuente en los pacientes que sufren síndrome de LTP. El objetivo del estudio fue investigar la frecuencia del síndrome de LTP en una muestra de pacientes alérgicos a lechuga y evaluar su patrón clínico.

Métodos: Se determinó la IgE específica a Pru p 3 y a lechuga en una muestra de 30 pacientes con un diagnóstico de alergia a la lechuga. Se evaluaron los síntomas con otras LTPs de alimentos de origen vegetal y la presencia de cofactores.

Resultados: Los síntomas clínicos de la alergia a lechuga fueron frecuentemente graves, ya que 18/30 pacientes experimentaron anafilaxia. Todos los pacientes experimentaron reacciones alérgicas a otros alimentos vegetales. En 13/30 pacientes, los cofactores estaban implicados en las manifestaciones clínicas. Se observó que el 90% de los pacientes estaban sensibilizados a pólenes.

Conclusiones: La alergia a la lechuga más que de forma aislada, ocurre en el contexto del síndrome LTP y se caracteriza por su frecuente asociación a cofactores y la gravedad de sus reacciones.

Palabras clave: Anafilaxia. Cofactor. Alergia alimentaria. Alergia a la lechuga. LTP. Síndrome LTP.

Introduction

Lipid transfer protein (LTP) sensitization is by far the most common cause of food allergy in the Mediterranean area [1,2], and in most cases peach allergy is the primary sensitizer [3,4].

While some patients remain allergic to just 1 plant-derived food, others tend to develop sensitization or allergy to a wide variety of unrelated plant foods and/or pollens. This condition has been termed *lipid transfer protein syndrome* [5] and is a consequence of the high degree of IgE cross-reactivity between lipid transfer proteins (LTPs), including those that are taxonomically distant [6-8]. Among the peculiarities of this syndrome are its geographical distribution (limited to the Mediterranean area), the frequent need for cofactors to elicit clinical reactivity, and reduced severity when pollen allergy is present [2,4].

It is also true that patients with LTP syndrome show a complex clinical pattern and multiple sensitizations to plant foods and pollens that complicate management [9-10]. The main offending foods reported by patients, and confirmed by sensitization in skin prick tests (SPTs), are peach (75.6%), lettuce (48.9%), walnut (46.7%), and hazelnut (33.3%) [7].

Although lettuce is one of the most frequent offending foods related to LTP syndrome, little is known about the peculiarities of lettuce allergy, as there have been few case reports and only 3 case series have been described to date [11-13]. The aim of this study was to define the clinical characteristics of lettuce allergy and the frequency of LTP syndrome in a cohort of lettuce-allergic patients.

Materials and Methods

Patients referred with suspected food allergy to the outpatient clinic of Hospital Vall d'Hebron in Barcelona, Spain between 2010 and 2011 were studied. Lettuce allergy was diagnosed in patients with a clear history of adverse reactions suggestive of IgE-mediated allergy, along with a positive skin prick test (SPT) and/or food challenge test, in accordance with the diagnostic algorithm described by Ibañez et al [14]. Patients with severe systemic reactions to lettuce or with typical, recent, repeated, and unequivocal reactions to lettuce, with positive skin tests, did not undergo a diagnostic oral challenge test. Cofactor-enhanced food allergy was diagnosed according to a protocol proposed by our group [15].

Symptoms elicited by other LTP-containing plant foods and the presence of cofactors were recorded. LTP syndrome was defined as sensitization to Pru p 3 (peach LTP) and symptoms induced by 2 or more unrelated plant foods. A detailed clinical history of symptoms related to other plant foods was recorded for all patients using the same criteria as described above. The protocol was approved by the hospital's ethics committee and patients provided informed consent to be included in the study.

SPTs were performed using commercial extracts of romaine lettuce (LETI Laboratories, S.L., Barcelona, Spain) and peach (ALK-Abello Laboratories, Madrid, Spain). For skin prick-to-prick tests, a lancet was pricked into the fresh leaves of different varieties of lettuce just before it was pricked into the skin, according to the standard method [16]. SPTs were also performed according to standard procedures with

common commercial panels of plant-food allergenic sources and pollens present in our area (plane tree, mugwort, grass, wall pellitory, olive, cypress). Specific IgE to lettuce and Pru p 3 were determined by ImmunoCAP (Phadia, Thermo Fisher Scientific) and/or ImmunoCAP-ISAC 103 or 112 (Phadia, Thermo Fisher Scientific).

Specific IgE to Lac s 1 (lettuce LTP) had been qualitatively assessed by means of immunoblotting and mass spectrometry analysis in a previous study by our group [13].

Results

Thirty lettuce-allergic patients (21 females and 9 males), with an average age of 30.5 years (range, 16-60 years), were included. Their clinical features are shown in Table 1.

Clinical symptoms to lettuce were predominantly severe, with 60% of patients (18/30) experiencing anaphylaxis after lettuce ingestion (Table 2), mainly in the context of cofactor involvement (13/18). Altogether anaphylactic reactions induced by cofactors accounted for 43% of the reactions; exercise was the most common cofactor (53.8%), followed by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (23%). In 3 patients more than 1 of the cofactors considered (NSAIDs, exercise, and alcohol) was involved.

Oral allergy syndrome and urticaria/angioedema were reported for 20% and 10% of the patients respectively and 3 patients (10%) reported gastrointestinal complaints only (Table 2).

Lettuce sIgE was negative in 11 patients, and overall, the positive levels were low with a median of 0.99 kU/L (range, 0.11-5.97).

Lac s 1 recognition by immunoblotting was found in 80% of patients in a previous study by our group (Table 1). In addition, specific IgE to Pru p 3 measured by ImmunoCAP was positive in all but 1 patient.

Serum from 24 of the 30 patients was available to perform ImmunoCAP-ISAC; the 103-ISAC panel was used in 15 cases and the more recent 112-ISAC panel in 9. Sensitization to at least 2 LTPs in the panel (Pru p 3, Ara h 9, Jug r 3, Cor a 8, Art v 3, and Pla a 3) was observed in 87% of cases; the distribution of frequencies is shown in Table 3. Just 3 patients were sensitized to other plant food allergens in the microarray panel (profilin, Bet-v1 homologues, thaumatin, calcium-binding protein, vicilin, 2s-albumin, 11-s albumin, gliadin, papain-like cysteine protease, and expansin). One patient was sensitized to kiwi thaumatin-like protein (TLP) and 2 patients, both with grass pollinosis, were sensitized to profilins.

Sensitization to pollens was found in 90% of patients, 86% of whom reported rhinitis and/or asthma symptoms. Of the pollen-sensitized patients, 76.7% were sensitized to plane tree and 60% to mugwort; these pollens are known to contain LTP. Polysensitization to pollens and other plant foods was not associated with reaction severity.

All patients were sensitized to plant foods other than lettuce, and most of them (90%) had a previous history of allergic reactions to other plant foods, mainly stone fruits (Rosaceae) and tree nuts (Table 4). The remaining 10% had experienced their first reaction with lettuce and had subsequently developed symptoms with other plant foods.

Table 1. Clinical Features and In Vitro Sensitization of Lettuce-Allergic Patients

Patient	Age, y	Sex	Symptoms Upon Lettuce Ingestion	Sensitization to Other Plant Foods	Sensitization to Pollens	Total IgE, kU/L	Lettuce sIgE, kU/L	rPr p 3 sIgE	Lettuce Allergen Recognition ^a
1	43	M	CEFA/NSAID	Be, L, Ro	Pl	52	0.39	4.3 ISU	LTP
2	56	M	CEFA OH	L, Ro, N	Pl, Ar	316	1.06	3.5 ISU	TLP & AP
3	23	F	CEFA EX	Ro, N, To	Pl, Ar	92.1	0.51	4.6 kU/L	LTP & TLP & AP
4	34	M	CEFA EX	Ce, Ro, N	Ar, G, P	366	0.91	16.9 kU/L	LTP
5	21	F	CEFA EX	Ki, Ro, N	Pl, Ar	25	0.61	33 ISU	LTP & TLP & AP
6	42	F	CEFA EX	Ro	-	15.5	0	3.5 ISU	LTP & TLP & AP
7	60	F	CEFA/NSAID/OH	Pe, Ro, N, Me	P	27	0.15	0	TLP & AP
8	41	F	CEFA/NSAID	Ro, N, Me	Pl, Ar	26	0.26	1.9 ISU	LTP
9	22	F	CEFA EX	Ro, N	G	2078	2.54	48 ISU	LTP & TLP & AP
10	45	M	CEFA/NSAID	L, Ro, N, To	Pl	120	0.06	1.02 kU/L	LTP & TLP & AP
11	25	F	CEFA EX	N, Mu, Ba	Ar, G, P, O	177	3.86	11 ISU	LTP & TLP & AP
12	30	M	CEFA/NSAID/EX	Ro, N	Pl, Ar, G, Cu, O	149	2.74	43.3 kU/L	LTP
13	16	F	CEFA EX	Be, Ce, N, Mu, To	Pl, Cyn, P, Phrg, Mer, O	79	4.3	NR	LTP & TLP & AP
14	30	F	GI	Ki, Ro, N	Pl	54	0	2.08 kU/L	TLP & AP
15	33	F	GI	L, Ro, N, Mu	Pl, Ar	71.4	0.31	11 ISU	LTP
16	23	F	GI	Ce, Ro, N, Gra, Me	-	23	0.42	2.5 ISU	LTP
17	19	F	AF	L, Ce, Ro, N, Mu, Av	Pl, G, Phrg, Cu, Ptg	78	0.10	0.56 kU/L	LTP
18	31	F	AF	Ro, N, To	Pl, Ar, G	148	1.81	2.3 ISU	LTP & TLP & AP
19	24	F	AF	L, N	Pl, Ar	131	0.96	1.3 ISU	LTP
20	39	M	AF	L, Ro, N, To	-	701	2.06	26.10 kU/L	TLP & AP
21	29	F	AF	Be, Ro, Gra, To, Ba	Pl	198	0.11	2.8 ISU	LTP & TLP & AP
22	29	F	SAO	L, Pe, Ki, Ro, N, Mu, To, On	Pl, Ar, O, Ptg	121	1.36	1.5 ISU	LTP & TLP & AP
23	44	M	SAO	Ro, N	Pl, Ar, P	236	0.32	7.1 ISU	LTP
24	29	F	SAO	Ce, Ro, N, Mu, To	L, Ar, P	54	1.2	9.52 kU/L	LTP & TLP & AP
25	22	F	SAO	Ro, N, To	Pl	414	0.99	11 ISU	TLP & AP
26	37	F	SAO	L, Ro, N, Me, Av	Pl, Ar	64	0.06	4.52 kU/L	LTP
27	24	M	SAO	Ro, N	Pl, Ar, P	220	1.96	85 ISU	LTP
28	35	F	U/AE	L, Pe, Ce, Ro, N, Me, Fi	Pl, Ar, G, P, Phrg, Cu, O, Ptg, Mer	74	0.14	0	LTP & TLP & AP
29	44	M	U/AE	Be, Ro, N	Pl, Ar, G, O	1091	5.97	21 ISU	LTP & TLP & AP
30	38	F	U/AE	Ki, Ro, N	Pl, Ar, P	37	2.71	16 ISU	TLP & AP

Abbreviations: Symptoms: AE, angioedema; AF, anaphylaxis; CEFA, cofactor-enhanced food allergy; GI, gastrointestinal symptoms; OAS, oral allergy syndrome; U, urticaria. Aeroallergens: Ar, Artemisia; Cu, Cupressus; Cyn, Cynodon; G, grass mix; Mer, Mercurialis; O, Olea; P, Parietaria; Pl, plane tree; Ptg, Plantago; Phrg, Phragmites. Foods: Av, avocado; Ba, banana; Be, green bean; Ce, cereals; Fi, fig; Gra, grape; Ki, kiwi; L, legume; Me, melon; Mu, mustard; N, nuts; On, onion; Pe, green pepper; Ro, Rosaceae fruits; To, tomato. Lettuce allergens: LTP, lipid transfer protein; TLP, thaumatin-like protein; AP, aspartyl protease. Units: ISU, ISAAC standardized units; sIgE, specific IgE.

^aAs previously described in Muñoz-García E, Luengo-Sánchez O, Haroun-Díaz E, Maroto AS, Palacin A, Díaz-Perales A, de las Heras GM, Labrador-Horrillo M, Vivanco F, Cuesta-Herranz J, Pastor-Vargas C. Identification of thaumatin-like protein and aspartyl protease as new major allergens in lettuce (*Lactuca sativa*). Mol Nutr Food Res. 2013;57:2245-52.

Table 2. Symptoms Elicited by Lettuce Allergy

Lettuce Symptoms	% (No./Total)
Anaphylaxis	60 (18/30)
- CEFA	43.3 (13/30)
Exercise	7/13
NSAID	3/13
Alcohol	1/13
>1 of above cofactors	2/13
Oral allergy syndrome	20% (6/30)
Gastrointestinal symptoms	10% (3/30)
Urticaria/angioedema	10% (3/30)

Abbreviations: CEFA, cofactor-enhanced food allergy; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug.

Table 3. Frequency of Sensitization to Lipid Transfer Proteins, Profilins, and Bet v1 Homologues by Immunocap-ISAC

Allergen	ISAC 103 No. Positive Results/Total	ISAC 112 No. Positive Results/Total	Overall Sensitization, %
Prup 3	14/15	7/9	87.5%
Jug r 3	NP	7/9	78%
Am h 9	NP	6/9	67%
Cor a 8	10/15	4/9	44%
Pia a 3	NP	7/9	87.5%
Art v 3	10/15	4/9	44%
Bet v1 homologues	0/15	0/9	0%
Profilins	0/15	2/9	8.3%

Abbreviation: NP, not present.

Table 4. Concomitant Plant Food Sensitizations

Other Plant Foods	% (No./Total)
Peach	90 (27/30)
Tree nuts	90 (27/30)
Legumes	33.3 (10/30)
Tomato	30 (9/30)
Cereals	20 (6/30)
Mustard	20 (6/30)
Melon	16.66 (5/30)
Runner bean	13.33 (4/30)

With 1 exception, all the patients were sensitized to peach (positive SPT and/or sIgE), with symptoms ranging from contact urticaria to anaphylaxis. Allergic reactions to peach were predominantly mild, with half of the patients experiencing only oral allergy symptoms or contact urticaria (Table 5).

Table 5. Symptoms Elicited by Peach

Symptoms	% (No./Total)
Oral allergy syndrome	30 (9/30)
Urticaria/angioedema	13.3 (4/30)
Peel contact urticaria	26.6 (8/30)
Anaphylaxis	16.66 (5/30)
Asymptomatic sensitization	10 (3/30)
No peach sensitization	3.3 (1/30)

Considering that 29 of the 30 lettuce-allergic patients were sensitized to Prup 3 and that all of them were sensitized to and reported symptoms with more than 2 unrelated plant foods, 96.6% of the sample were considered to have LTP syndrome.

Discussion

In our population, lettuce allergy occurred in the context of LTP syndrome. Our results indicate that lettuce allergy is mostly due to sensitization to LTP (Lac s 1), supporting previous reports [11], and seems to be driven by peach allergy. In most cases, patients reported having experienced reactions with peach prior to developing symptoms with lettuce and the majority had positive sIgE to peach LTP (Prup 3), with proven cross-reactivity with lettuce LTP. Taken together, these observations suggest that peach acted as the primary sensitizer.

Lettuce allergy is an increasingly common condition in our population. Lettuce has several peculiarities that frequently impede its being recognized as responsible for an allergic reaction. First, it is seldom eaten alone and reactions normally occur after eating a salad containing not only lettuce but other vegetables all containing LTP. Second, in many cases, a cofactor (mainly exercise or a NSAID) is needed to elicit the reaction, and consequently, patients may tolerate lettuce or experience only mild symptoms on a regular basis when exercise and NSAID are not present in the hours preceding or following intake. Clinical expression of sensitization is thus extremely variable, and is seemingly dependent on the presence/absence of a number of cofactors [4]. This implies that the presence of cofactors should always be assessed when studying a possible case of lettuce allergy and that tolerance after an index reaction does not rule out lettuce allergy [15,17-19].

ImmunoCAP seems to have very low sensitivity to lettuce sIgE, probably due to the low allergen content (not only of Lac s 1) in lettuce extracts.

All the patients in our series reported adverse reactions to other LTP-containing plant foods, mostly stone fruits (Rosaceae) and tree nuts. Interestingly, only 5 patients had anaphylactic reactions to peach; the rest had mild symptoms. This may be because patients generally avoid peach after the first reaction but continue to eat other LTP-containing plant foods.

Lettuce LTP was found to be the major allergen in our series, supporting previous reports [13]. However, while this LTP was recognized in 80% of lettuce-allergic patients, peach LTP was recognized in an even higher proportion and

87% of patients had positive results to more than 2 LTPs in the ISAC microarray. Similar results have been observed in peanut-allergic patients in Spain. The patients had both higher levels and a higher frequency of recognition of Pru p 3 than Ara h 9 and many of them had a previous history of peach allergy [20]. The inhibition assays indicated that Pru p 3 was the primary sensitizer.

In our study, the hypothesis of peach-driven lettuce allergy is supported by both clinical history and a higher frequency of Pru p 3 sensitization. Further inhibition studies, however, are needed to confirm this.

It is striking that 90% of our patients were sensitized to pollen. An association between LTP-mediated food allergy and pollinosis has been described in the Mediterranean area [1-21] mainly with pollen LTP from plane tree (Pla a 3) [7,12,22-24] and mugwort (Art v 3) [25-31]. The high prevalence of sensitization to these pollens in our patients—76% and 60%, respectively—supports the hypothesis of LTP and food pollen syndrome in our area [3,28]. However, as the aim of our study was to characterize a sample of lettuce-allergic patients, we did not include a control group and were therefore unable to perform association studies.

Lettuce was not the first food trigger of an allergic reaction in most of the patients in our series, but it became part of the LTP syndrome. Lettuce allergy must therefore be considered when evaluating patients with multiple plant food allergies. Furthermore, we recommend that lettuce-allergic patients avoid cofactors because of the high risk of severe reactions.

Taken together, the findings of this study provide insight into the peculiarities of lettuce allergy, which is mostly due to sensitization to LTP and seems to be driven by peach allergy. In the majority of cases, lettuce was not the first offending food but it became part of the LTP syndrome, eliciting severe allergic reactions frequently enhanced by concomitant cofactors.

Funding

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI10/00974 and PI13/00928) and RETIC Red de Investigación de Reacciones Adversas a Alérgenos y Fármacos (RD12/0013/0013, RD12/0013/0014, and RD12/0013/0015), co-supported by FEDER grants.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1336-41.
- Cuesta-Herranz J, Barber D, Blanco C, Cistero-Bahima A, Crespo JF, Fernandez-Rivas M, Fernandez-Sanchez J, Florido JF, Ibanez MD, Rodriguez R, Salcedo G, Garcia BE, Lombardero M, Quiralte J, Rodriguez J, Sanchez-Monge R, Vereda A, Villalba M, Alonso Diaz de Durana MD, Basagana M, Carrillo T, Fernandez-Nieto M, Tabar AI. Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153:182-92.
- Palacin A, Gomez-Casado C, Rivas LA, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, Blanco C, Carrillo T, Cuesta-Herranz J, de FC, Alvarez-Eire GG, Fernandez FI, Gamboa P, Munoz R, Sanchez-Monge R, Sirvent S, Torres MJ, Varela-Losada S, Rodriguez R, Pairo V, Blanca M, Salcedo G, Diaz-Perales A. Graph based study of allergen cross-reactivity of plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study. *PLoS One*. 2012;7:e50799.
- Asero R, Pravettoni V. Anaphylaxis to plant-foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013;13:379-85.
- Pastorello EA, Robino AM. Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Mol Nutr Food Res*. 2004;48:356-62.
- Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F, van RR. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy*. 2002;57:900-6.
- Pascal M, Munoz-Cano R, Reina Z, Palacin A, Vilella R, Picado C, Juan M, Sanchez-Lopez J, Rueda M, Salcedo G, Valero A, Yague J, Bartra J. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:1529-39.
- Tordesillas L, Sirvent S, Diaz-Perales A, Villalba M, Cuesta-Herranz J, Rodriguez R, Salcedo G. Plant lipid transfer protein allergens: no cross-reactivity between those from foods and olive and Parietaria pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;156:291-6.
- Scala E, Till SJ, Asero R, Abern D, Guerra EC, Pirrotta L, Paganelli R, Pomponi D, Giani M, De PO, Cecchi L. Lipid transfer protein sensitization: reactivity profiles and clinical risk assessment in an Italian cohort. *Allergy*. 2015;70:933-43.
- Uasuf CG, Villalta D, Conte ME, Di SC, Barralle M, Cantisano V, Pace E, Gjornmark M, Gangemi S, Brusca I. Different co-sensitizations could determine different risk assessment in peach allergy? Evaluation of an anaphylactic biomarker in Pru p 3 positive patients. *Clin Mol Allergy*. 2015;13:30.
- Hartz C, San Miguel-Moncin MM, Cistero-Bahima A, Fotisch K, Metzner KJ, Fortunato D, Lidholm L, Vieths S, Scheurer S. Molecular characterisation of Lac s 1, the major allergen from lettuce (*Lactuca sativa*). *Mol Immunol*. 2007;44:2820-30.
- San Miguel-Moncin M, Krail M, Scheurer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, Cistero-Bahima A, Vieths S. Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy*. 2003;58:511-7.
- Munoz-Garcia E, Luengo-Sanchez O, Haroun-Diaz E, Maroto AS, Palacin A, Diaz-Perales A, de las Heras GM, Labrador-Horrillo M, Vivanco F, Cuesta-Herranz J, Pastor-Vargas C. Identification of thaumatin-like protein and aspartyl protease as new major allergens in lettuce (*Lactuca sativa*). *Mol Nutr Food Res*. 2013;57:2245-52.
- Ibanez MD, Alonso E, Blanco C, Cistero A, Cuesta-Herranz J, Fernandez-Rivas M, Florido JF, Garcia BE, Laffond E, Martin ME, Nieto A, Rico MA, Rodriguez J. Metodología diagnóstica en la alergia a alimentos. *Alergol Immunol Clin*. 1999;14(2):50-62.
- Cardona V, Luengo O, Garriga T, Labrador-Horrillo M, Sala-Cunill A, Izquierdo A, Soto L, Guiltarte M. Co-factor-enhanced food allergy. *Allergy*. 2012;67:1316-8.

16. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*. 1989;44 Suppl 10:1-59.
17. Wolbing F, Fischer J, Koberle M, Kaesler S, Biedermann T. About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy*. 2013;68:1085-92.
18. Niggemann B, Beyer K. Factors augmenting allergic reactions. *Allergy*. 2014;69:1582-7.
19. Romano A, Scala E, Rumi G, Gaeta F, Caruso C, Alonzi C, Maggioletti M, Ferrara R, Palazzo P, Palmieri V, Zeppilli P, Mari A. Lipid transfer proteins: the most frequent sensitizer in Italian subjects with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:1643-53.
20. Javaloyes G, Goicoechea MJ, García Nuñez I, Aranda A, Sanz ML, Blanca M, Díaz Perales A, da Souza J, Esparza I, del Pozo V, Blázquez AB, Scheurer S, Vieths S, Ferrer M. Pru p 3 acts as a strong sensitizer for peanut allergy in Spain. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1432-4.
21. Zuidmeer L, van RR. Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:269-73.
22. Lauer I, Miguel-Moncin MS, Abel T, Foetisch K, Hartz C, Fortunato D, Cistero-Bahima A, Vieths S, Scheurer S. Identification of a plant pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:261-9.
23. Enrique E, Cistero-Bahima A, Bartolomé B, Alonso R, San Miguel-Moncin MM, Bartra J, Martínez A. *Platanus acerifolia* pollinosis and food allergy. *Allergy*. 2002;57:351-6.
24. Miralles JC, Caravaca F, Guillén E, Lombardero M, Negro JM. Cross-reactivity between *Platanus* pollen and vegetables. *Allergy*. 2002;57:146-9.
25. Sánchez-López J, Tordesillas L, Pascual M, Muñoz-Cano R, Garrido M, Rueda M, Vilella R, Valero A, Díaz-Perales A, Picado C, Bartra J. Role of Art v 3 in pollinosis of patients allergic to Pru p 3. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:1018-25.
26. Gadermaier G, Harter A, Girbl T, Palazzo P, Himly M, Vogel L, Briza P, Mari A, Ferreira F. Isoform identification and characterization of Art v 3, the lipid-transfer protein of mugwort pollen. *Mol Immunol*. 2009;46:1919-24.
27. Lombardero M, García-Selles FJ, Polo F, Jimeno L, Chamorro MJ, García-Casado G, Sánchez-Monge R, Díaz-Perales A, Salcedo G, Barber D. Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1415-21.
28. Díaz-Perales A, Lombardero M, Sánchez-Monge R, García-Selles FJ, Pernas M, Fernández-Rivas M, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:1403-10.
29. García-Selles FJ, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, Alcantara M, Lombardero M, Barber D, Salcedo G, Fernández-Rivas M. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an in vivo study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128:115-22.
30. Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Conti A, Ispano M, Fortunato D, Bengtsson A, Bianchi M. Hypersensitivity to mugwort (*Artemisia vulgaris*) in patients with peach allergy is due to a common lipid transfer protein allergen and is often without clinical expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:310-7.
31. Egger M, Hauser M, Mari A, Ferreira F, Gadermaier G. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010;10:326-335.

|| Manuscript received March 28, 2016; accepted for publication, September 8, 2016.

|| Carlos Pastor Vargas

Department of Immunology
Hospital Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos 2
28040 Madrid, Spain
E-mail: cpastor@fjd.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernandez RM. Food allergy in Alergologica-2005. J Investig Allergol Clin Immunol 2009; 19 Suppl 2:37-44.
2. Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindselev-Jensen C, Bjorksten B, Moneret-Vautrin D, Wuthrich B. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. Allergy 1995; 50:623-35.
3. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, Van CP, van Hage-Hamsten M, Wuthrich B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Allergy 2001; 56:813-24.
4. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van CP, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. J Allergy Clin Immunol 2004; 113:832-6.
5. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton MJ, Arshad SH, Bahna SL, Beck LA, Byrd-Bredbenner C, Camargo CA, Jr., Eichenfield L, Furuta GT, Hanifin JM, Jones C, Kraft M, Levy BD, Lieberman P, Luccioli S, McCall KM, Schneider LC, Simon RA, Simons FE, Teach SJ, Yawn BP, Schwaninger JM. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. J Allergy Clin Immunol 2010; 126:1105-18.
6. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. J Allergy Clin Immunol 2010; 125:S116-S125.
7. Faber M, Sabato V, De WL, Van GA, Hagendorens MM, Leysen J, Bridts CH, De Clerck LS, Ebo DG. State of the art and perspectives in food allergy (part I): diagnosis. Curr Pharm Des 2014; 20:954-63.
8. Ibanez MD, Alonso E, Blanco C, CisteroA., Cuesta-Herranz J, Fernandez-Rivas M, Florido JF, Garcia BE, Laffond E, Martin MF, Nieto A, Rico MA, Rodriguez J. Metodología diagnóstica en la alergia a alimentos. Alergol Inmunol Clin 14[2], 50-62. 1999.
9. Wood RA. Diagnostic elimination diets and oral food provocation. Chem Immunol Allergy 2015; 101:87-95.
10. Wang J, Sampson HA. Food allergy. J Clin Invest 2011; 121:827-35.
11. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among children in the United States. Pediatrics 2009; 124:1549-55.
12. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Cardona V, Dubois AE, Halken S, Hoffmann-Sommergruber K, Poulsen LK, Roberts G, van RR, Vlieg-Boerstra BJ, Sheikh A. The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. Allergy 2014; 69:62-75.

BIBLIOGRAFÍA

13. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:594-602.
14. Fernandez-Rivas M, Benito C, Gonzalez-Mancebo E, de Durana DA. Allergies to fruits and vegetables. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19:675-81.
15. Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:1187-97.
16. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:805-19.
17. Burks AW, Tang M, Sicherer S, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, Fiocchi A, Chiang W, Beyer K, Wood R, Hourihane J, Jones SM, Lack G, Sampson HA. ICON: food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:906-20.
18. Eriksson NE, Formgren H, Svenonius E. Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. *Allergy* 1982; 37:437-43.
19. Cuesta-Herranz J, Lazaro M, De las HM, Lluch M, Figueredo E, Umpierrez A, Hernandez J, Cuesta C. Peach allergy pattern: experience in 70 patients. *Allergy* 1998; 53:78-82.
20. Burney P, Summers C, Chinn S, Hooper R, van RR, Lidholm J. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy* 2010; 65:1182-8.
21. Cuesta-Herranz J, Barber D, Blanco C, Cistero-Bahima A, Crespo JF, Fernandez-Rivas M, Fernandez-Sanchez J, Florido JF, Ibanez MD, Rodriguez R, Salcedo G, Garcia BE, Lombardero M, Quirarte J, Rodriguez J, Sanchez-Monge R, Vereda A, Villalba M, Alonso Diaz de Durana MD, Basagana M, Carrillo T, Fernandez-Nieto M, Tabar AI. Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 153:182-92.
22. Hernandez J, Garcia Selles FJ, Pagan JA, Negro JM. [Immediate hypersensitivity to fruits and vegetables and pollenosis]. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1985; 13:197-211.
23. Pascal M, Munoz-Cano R, Reina Z, Palacin A, Vilella R, Picado C, Juan M, Sanchez-Lopez J, Rueda M, Salcedo G, Valero A, Yague J, Bartra J. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:1529-39.
24. Cardona V, Luengo O, Garriga T, Labrador-Horrillo M, Sala-Cunill A, Izquierdo A, Soto L, Guilarte M. Co-factor-enhanced food allergy. *Allergy* 2012; 67:1316-8.
25. Larramendi CH, Ferrer A, Huertas AJ, Garcia-Abujeta JL, Andreu C, Tella R, Cerda MT, Bartra J, Lavin JR, Pagan JA, Lopez-Matas MA, Fernandez-Caldas E, Carnes J. Sensitization to tomato peel and pulp extracts in the Mediterranean Coast of Spain: prevalence and co-sensitization with aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:169-77.
26. Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988; 61:47-52.
27. Price A, Ramachandran S, Smith GP, Stevenson ML, Pomeranz MK, Cohen DE. Oral allergy syndrome (pollen-food allergy syndrome). *Dermatitis* 2015; 26:78-88.

BIBLIOGRAFÍA

28. Mari A, Ballmer-Weber BK, Vieths S. The oral allergy syndrome: improved diagnostic and treatment methods. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:267-73.
29. Bartra J, Sastre J, del CA, Montoro J, Jauregui I, Davila I, Ferrer M, Mullol J, Valero A. From pollinosis to digestive allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19 Suppl 1:3-10.
30. Poza-Guedes P, Barrios Y, Gonzalez-Perez R, Sanchez-Machin I, Franco A, Matheu V. Role of specific IgE to beta-lactoglobulin in the gastrointestinal phenotype of cow's milk allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2016; 12:7.
31. Cardona D, V. [Guideline for the management of anaphylaxis]. *Med Clin (Barc)* 2011; 136:349-55.
32. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Jr., Bock SA, Branum A, Brown SG, Camargo CA, Jr., Cydulka R, Galli SJ, Gidudu J, Gruchalla RS, Harlor AD, Jr., Hepner DL, Lewis LM, Lieberman PL, Metcalfe DD, O'Connor R, Muraro A, Rudman A, Schmitt C, Scherrer D, Simons FE, Thomas S, Wood JP, Decker WW. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:391-7.
33. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:638-46.
34. Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Flabbee J, Beaudouin E, Kanny G. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy* 2005; 60:443-51.
35. Simons FE, Arduoso LR, Bilo MB, El-Gamal YM, Ledford DK, Ring J, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY. World allergy organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *World Allergy Organ J* 2011; 4:13-37.
36. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014; 69:992-1007.
37. Worm M, Moneret-Vautrin A, Scherer K, Lang R, Fernandez-Rivas M, Cardona V, Kowalski ML, Jutel M, Poziomkowska-Gesicka I, Papadopoulos NG, Beyer K, Mustakov T, Christoff G, Bilo MB, Muraro A, Hourihane JO, Grabenhenrich LB. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). *Allergy* 2014; 69:1397-404.
38. Wolbing F, Fischer J, Koberle M, Kaesler S, Biedermann T. About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy* 2013; 68:1085-92.
39. Munoz-Cano R, Picado C, Valero A, Bartra J. Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2016; 26:73-82.
40. Niggemann B, Beyer K. Factors augmenting allergic reactions. *Allergy* 2014; 69:1582-7.
41. Romano A, Scala E, Rumi G, Gaeta F, Caruso C, Alonzi C, Maggioletti M, Ferrara R, Palazzo P, Palmieri V, Zeppilli P, Mari A. Lipid transfer proteins: the most frequent

BIBLIOGRAFÍA

- sensitizer in Italian subjects with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:1643-53.
42. Ehlers I, Hipler UC, Zuberbier T, Worm M. Ethanol as a cause of hypersensitivity reactions to alcoholic beverages. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1231-5.
 43. Garcia-Robaina JC, Torre-Morin F, Sanchez-Machin I, Sanchez-Monge R, Barber D, Lombardero M. Anaphylaxis induced by exercise and wine. *Allergy* 2001; 56:357-8.
 44. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG, Perono GL, Calamari AM, Brenna O, Conti A. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:350-9.
 45. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1989; 44 Suppl 10:1-59.
 46. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, Canonica GW, Carlsen KH, Cox L, Haahtela T, Lodrup Carlsen KC, Price D, Samolinski B, Simons FE, Wickman M, Annesi-Maesano I, Baena-Cagnani CE, Bergmann KC, Bindeslev-Jensen C, Casale TB, Chiriac A, Cruz AA, Dubakiene R, Durham SR, Fokkens WJ, Gerth-van-Wijk R, Kalayci O, Kowalski ML, Mari A, Mullol J, Nazamova-Baranova L, O'Hehir RE, Ohta K, Panzner P, Passalacqua G, Ring J, Rogala B, Romano A, Ryan D, Schmid-Grendelmeier P, Todo-Bom A, Valenta R, Woehrl S, Yusuf OM, Zuberbier T, Demoly P. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012; 67:18-24.
 47. van RR. Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:235-40.
 48. Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Ansaloni R, Magri GC. Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:683-90.
 49. Rosen JP, Selcow JE, Mendelson LM, Grodofsky MP, Factor JM, Sampson HA. Skin testing with natural foods in patients suspected of having food allergies: is it a necessity? *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:1068-70.
 50. Yunginger JW, Ahlstedt S, Eggleston PA, Homburger HA, Nelson HS, Ownby DR, Platts-Mills TA, Sampson HA, Sicherer SH, Weinstein AM, Williams PB, Wood RA, Zeiger RS. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:1077-84.
 51. Gupta RS, Lau CH, Hamilton RG, Donnell A, Newhall KK. Predicting outcomes of oral food challenges by using the allergen-specific IgE-total IgE ratio. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; 2:300-5.
 52. Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:7-13.

BIBLIOGRAFÍA

53. Wohrl S, Vigl K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarisch R, Prinz M, Stingl G, Kopp T. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy* 2006; 61:633-9.
54. Salcedo G, Diaz-Perales A. Component-resolved diagnosis of allergy: more is better? *Clin Exp Allergy* 2010; 40:836-8.
55. Luengo O, Cardona V. Component resolved diagnosis: when should it be used? *Clin Transl Allergy* 2014; 4:28.
56. van RR. Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:235-40.
57. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC, Mari A, Muraro A, Ollert M, Poulsen LK, Vieths S, Worm M, Hoffmann-Sommergruber K. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy* 2015; 70:1079-90.
58. Barber D, de la Torre F, Lombardero M, Antepara I, Colas C, Davila I, Tabar AI, Vidal C, Villalba M, Salcedo G, Rodriguez R. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1764-73.
59. Treudler R, Simon JC. Overview of component resolved diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; 13:110-7.
60. Sastre J. Molecular diagnosis in allergy. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:1442-60.
61. Treudler R, Simon JC. Overview of component resolved diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; 13:110-7.
62. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van HM, Baena-Cagnani CE, Melioli G, Nunes C, Passalacqua G, Rosenwasser L, Sampson H, Sastre J, Bousquet J, Zuberbier T. A. *World Allergy Organ J* 2013; 6:17.
63. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, Knulst AC, Moneret-Vautrin DA, Nekam K, Niggemann B, Osterballe M, Ortolani C, Ring J, Schnopp C, Werfel T. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods--position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; 59:690-7.
64. Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock SA, Sicherer SH, Teuber SS. Work Group report: oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:S365-S383.
65. Soares-Weiser K, Panesar SS, Rader T, Takwoingi Y, Werfel T, Muraro A, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Sheikh A. The diagnosis of food allergy: protocol for a systematic review. *Clin Transl Allergy* 2013; 3:18.
66. Fernandez-Rivas M, Garrido FS, Nadal JA, Diaz de Durana MD, Garcia BE, Gonzalez-Mancebo E, Martin S, Barber D, Rico P, Tabar AI. Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy* 2009; 64:876-83.

BIBLIOGRAFÍA

67. Garcia BE, Gonzalez-Mancebo E, Barber D, Martin S, Tabar AI, Diaz de Durana AM, Garrido-Fernandez S, Salcedo G, Rico P, Fernandez-Rivas M. Sublingual immunotherapy in peach allergy: monitoring molecular sensitizations and reactivity to apple fruit and Platanus pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; 20:514-20.
68. Garrido-Fernandez S, Garcia BE, Sanz ML, Echechipia S, Lizaso MT, Tabar AI. Are basophil activation and sulphidoleukotriene determination useful tests for monitoring patients with peach allergy receiving sublingual immunotherapy with a Pru p 3-enriched peach extract? *J Investig Allergol Clin Immunol* 2014; 24:106-13.
69. Gomez F, Bogas G, Gonzalez M, Campo P, Salas M, Diaz-Perales A, Rodriguez MJ, Prieto A, Barber D, Blanca M, Torres MJ, Mayorga C. The clinical and immunological effects of Pru p 3 sublingual immunotherapy on peach and peanut allergy in patients with systemic reactions. *Clin Exp Allergy* 2017; 47:339-50.
70. Fiocchi A, Pecora V, Valluzzi RL, Fierro V, Mennini M. Use of biologics in severe food allergies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2017; 17:232-8.
71. Brandstrom J, Vetander M, Lilja G, Johansson SG, Sundqvist AC, Kalm F, Nilsson C, Nopp A. Individually dosed omalizumab: an effective treatment for severe peanut allergy. *Clin Exp Allergy* 2017; 47:540-50.
72. Asero R. Disappearance of severe oral allergy syndrome following omalizumab treatment. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2017; 49:143-4.
73. Lorenz AR, Scheurer S, Vieths S. Food allergens: molecular and immunological aspects, allergen databases and cross-reactivity. *Chem Immunol Allergy* 2015; 101:18-29.
74. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:821-30.
75. Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:14-23.
76. Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H, Mills EN. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:163-70.
77. Harrer A, Egger M, Gadermaier G, Erler A, Hauser M, Ferreira F, Himly M. Characterization of plant food allergens: an overview on physicochemical and immunological techniques. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54:93-112.
78. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:847-52.
79. Bonds RS, Midoro-Horiuti T, Goldblum R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8:82-6.
80. Garcia BE, Lizaso MT. Cross-reactivity syndromes in food allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; 21:162-70.

BIBLIOGRAFÍA

81. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:27-36.
82. Brough HA, Simpson A, Makinson K, Hankinson J, Brown S, Douiri A, Belgrave DC, Penagos M, Stephens AC, McLean WH, Turcanu V, Nicolaou N, Custovic A, Lack G. Peanut allergy: effect of environmental peanut exposure in children with filaggrin loss-of-function mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:867-75.
83. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011; 365:1315-27.
84. Fernandez-Rivas M, van RR, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:728-33.
85. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, Baroglio C, Scibola E, Ansaloni R, Incorvaia C, Conti A. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:520-6.
86. Asero R. Detection and clinical characterization of patients with oral allergy syndrome caused by stable allergens in Rosaceae and nuts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 83:377-83.
87. Katelaris CH. Food allergy and oral allergy or pollen-food syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10:246-51.
88. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods: Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation on allergenicity of foods derived from Biotechnology. 2001. 2017.
89. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:881-90.
90. Miguères M, Davila I, Frati F, Azpeitia A, Jeanpetit Y, Lheritier-Barrand M, Incorvaia C, Ciprandi G. Types of sensitization to aeroallergens: definitions, prevalences and impact on the diagnosis and treatment of allergic respiratory disease. *Clin Transl Allergy* 2014; 4:16.
91. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodriguez R. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy* 2008; 63:1550-8.
92. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010; 6:1.
93. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1336-41.
94. Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:930-5.

BIBLIOGRAFÍA

95. Egger M, Hauser M, Mari A, Ferreira F, Gadermaier G. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010; 10:326-35.
96. van RR. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:910-3.
97. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771:781-91.
98. Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Garcia-Casado G, Salcedo G, Barber D. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *J Agric Food Chem* 2002; 50:7738-41.
99. Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello EA. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem* 2000; 48:493-7.
100. Garcia-Casado G, Crespo JF, Rodriguez J, Salcedo G. Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:647-9.
101. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, van RR. A case of allergy to beer showing cross-reactivity between lipid transfer proteins. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87:65-7.
102. Carnes J, Fernandez-Caldas E, Gallego MT, Ferrer A, Cuesta-Herranz J. Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy* 2002; 57:1071-5.
103. Fernandez-Rivas M, Cuevas M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1239-47.
104. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F, van RR. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* 2002; 57:900-6.
105. Diaz-Perales A, Sanz ML, Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Lombardero M, Polo F, Gamboa PM, Barber D, Salcedo G. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:628-33.
106. Lauer I, Miguel-Moncin MS, Abel T, Foetisch K, Hartz C, Fortunato D, Cistero-Bahima A, Vieths S, Scheurer S. Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:261-9.
107. Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Polo F, Jimeno L, Chamorro MJ, Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Salcedo G, Barber D. Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1415-21.

BIBLIOGRAFÍA

108. Garcia-Selles FJ, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Alcantara M, Lombardero M, Barber D, Salcedo G, Fernandez-Rivas M. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an in vivo study. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128:115-22.
109. Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pernas M, Fernandez-Rivas M, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1403-10.
110. Tordesillas L, Sirvent S, Diaz-Perales A, Villalba M, Cuesta-Herranz J, Rodriguez R, Salcedo G. Plant lipid transfer protein allergens: no cross-reactivity between those from foods and olive and *Parietaria* pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 156:291-6.
111. Pastorello EA, Robino AM. Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48:356-62.
112. Asero R, Antonicelli L, Arena A, Bommarito L, Caruso B, Crivellaro M, De CM, Della TE, Della TF, Heffler E, Lodi RF, Longo R, Manzotti G, Marcotulli M, Melchiorre A, Minale P, Morandi P, Moreni B, Moschella A, Murzilli F, Nebiolo F, Poppa M, Randazzo S, Rossi G, Senna GE. EpidemAAITO: features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:547-55.
113. Pascal M, Vazquez-Ortiz M, Folque MM, Jimenez-Feijoo R, Lozano J, Dominguez O, Piquer-Gibert M, Giner MT, Alvaro M, Dias da CM, Garcia-Paba B, Machinena A, Alsina L, Yague J, Plaza-Martin AM. Asymptomatic LTP sensitisation is common in plant-food allergic children from the Northeast of Spain. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2016; 44:351-8.
114. Asero R, Pravettoni V. Anaphylaxis to plant-foods and pollen allergens in patients with lipid transfer protein syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13:379-85.
115. Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, Benito C, Sanchez-Monge R, Salcedo G, Alonso MD, Rosado A, Tejedor MA, Vila C, Casas ML. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:789-95.
116. van RR. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:910-3.
117. Ballmer-Weber BK. Lipid transfer protein as a potential panallergen? *Allergy* 2002; 57:873-5.
118. Borghesan F, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Plebani M, Asero R. Respiratory allergy to lipid transfer protein. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147:161-5.
119. Palacin A, Quirce S, Armentia A, Fernandez-Nieto M, Pacios LF, Asensio T, Sastre J, Diaz-Perales A, Salcedo G. Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:1132-8.

BIBLIOGRAFÍA

120. Enrique E, Ahrazem O, Bartra J, Latorre MD, Castello JV, de Mateo JA, Montoya E, Malek T, Barber D, Salcedo G. Lipid transfer protein is involved in rhinoconjunctivitis and asthma produced by rice inhalation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:926-8.
121. Garcia BE, Lombardero M, Echechipia S, Olaguibel JM, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Barber D, Salcedo G, Tabar AI. Respiratory allergy to peach leaves and lipid-transfer proteins. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:291-5.
122. Smole U, Bublin M, Radauer C, Ebner C, Breiteneder H. Mal d 2, the thaumatin-like allergen from apple, is highly resistant to gastrointestinal digestion and thermal processing. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147:289-98.
123. Palacin A, Rivas LA, Gomez-Casado C, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, Blanco C, Carrillo T, Cuesta-Herranz J, Bonny JA, Flores E, Garcia-Alvarez-Eire MG, Garcia-Nunez I, Fernandez FJ, Gamboa P, Munoz R, Sanchez-Monge R, Torres M, Losada SV, Villalba M, Vega F, Parro V, Blanca M, Salcedo G, Diaz-Perales A. The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: a multicenter study using a specific protein microarray. *PLoS One* 2012; 7:e44088.
124. Hsieh LS, Moos M, Jr., Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:960-70.
125. Marzban G, Puehringer H, Dey R, Brynda S, Ma Y, Martinelli A. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Science* 2005 2017; 169:387-94.
126. Palacin A, Tordesillas L, Gamboa P, Sanchez-Monge R, Cuesta-Herranz J, Sanz ML, Barber D, Salcedo G, Diaz-Perales A. Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:1422-30.
127. Oberhuber C, Ma Y, Marsh J, Rigby N, Smole U, Radauer C, Alessandri S, Briza P, Zuidmeer L, Maderegger B, Himly M, Sancho AI, van RR, Knulst A, Ebner C, Shewry P, Mills EN, Wellner K, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Bublin M. Purification and characterisation of relevant natural and recombinant apple allergens. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52 Suppl 2:S208-S219.
128. Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, Asero R, van LA, Bohle B, Ma Y, Ebner C, Rigby N, Sancho AI, Miles S, Zuidmeer L, Knulst A, Breiteneder H, Mills C, Hoffmann-Sommergruber K, van RR. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:481-8.
129. Inschlag C, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Scheiner O, Breiteneder H. Biochemical characterization of Pru a 2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*). *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116:22-8.
130. Jensen-Jarolim E, Santner B, Leitner A, Grimm R, Scheiner O, Ebner C, Breiteneder H. Bell peppers (*Capsicum annum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116:103-9.

BIBLIOGRAFÍA

131. Gavrovic-Jankulovic M, clrkovic T, Vuckovic O, Atanaskovic-Markovic M, Petersen A, Gojgic G, Burazer L, Jankov RM. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:805-10.
132. Garrido-Arandia M, Murua-Garcia A, Palacin A, Tordesillas L, Gomez-Casado C, Blanca-Lopez N, Ramos T, Canto G, Blanco C, Cuesta-Herranz J, Sanchez-Monge R, Pacios LF, Diaz PA. The role of N-glycosylation in kiwi allergy. *Food Sci Nutr* 2014; 2:260-71.
133. Palacin A, Rodriguez J, Blanco C, Lopez-Torrejon G, Sanchez-Monge R, Varela J, Jimenez MA, Cumplido J, Carrillo T, Crespo JF, Salcedo G. Immunoglobulin E recognition patterns to purified Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) allergens in patients sensitized to Kiwi with different clinical symptoms. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:1220-8.
134. Palacin A, Quirce S, Sanchez-Monge R, Bobolea I, Diaz-Perales A, Martin-Munoz F, Pascual C, Salcedo G. Sensitization profiles to purified plant food allergens among pediatric patients with allergy to banana. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22:186-95.
135. Lehto M, Airaksinen L, Puustinen A, Tillander S, Hannula S, Nyman T, Toskala E, Alenius H, Lauerma A. Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 104:139-46.
136. Gandolfo-Cano M, Gonzalez-Mancebo E, Gonzalez-de-Olano D, Mohedano-Vicente E, Munoz-Garcia E, Bartolome B, Pastor-Vargas C. Lipid transfer proteins and thaumatins as relevant allergens in melon peel allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012; 109:224-5.
137. Cortegano I, Civantos E, Aceituno E, del MA, Lopez E, Lombardero M, del P, V, Lahoz C. Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy* 2004; 59:485-90.
138. Palomares O, Alcantara M, Quiralte J, Villalba M, Garzon F, Rodriguez R. Airway disease and thaumatin-like protein in an olive-oil mill worker. *N Engl J Med* 2008; 358:1306-8.
139. Larramendi CH, Lopez-Matas MA, Ferrer A, Huertas AJ, Pagan JA, Navarro LA, Garcia-Abujeta JL, Andreu C, Carnes J. Prevalence of sensitization to *Cannabis sativa*. Lipid-transfer and thaumatin-like proteins are relevant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 162:115-22.
140. Palacin A, Quirce S, Sanchez-Monge R, Bobolea I, Diaz-Perales A, Martin-Munoz F, Pascual C, Salcedo G. Sensitization profiles to purified plant food allergens among pediatric patients with allergy to banana. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22:186-95.
141. Breiteneder H. Thaumatin-like proteins -- a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* 2004; 59:479-81.
142. Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:920-9.
143. Santos A, van RR. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155:191-204.

BIBLIOGRAFÍA

144. Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 1991; 253:557-60.
145. Sirvent S, Tordesillas L, Villalba M, Diaz-Perales A, Cuesta-Herranz J, Salcedo G, Rodriguez R. Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 106:429-35.
146. Sanchez-Salguero CA. Are profilins relevant allergens or confusion allergens? *Allergol Immunopathol (Madr)* 2014; 42:267-8.
147. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodriguez R. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy* 2008; 63:1550-8.
148. Asero R, Monsalve R, Barber D. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:1033-7.
149. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Zanoni D, Barocci F, Caldironi G. Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:427-32.
150. Alvarado MI, Jimeno L, de la Torre F, Boissy P, Rivas B, Lazaro MJ, Barber D. Profilin as a severe food allergen in allergic patients overexposed to grass pollen. *Allergy* 2014; 69:1610-6.
151. Bohle B. The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy* 2007; 62:3-10.
152. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC, Mari A, Muraro A, Ollert M, Poulsen LK, Vieths S, Worm M, Hoffmann-Sommergruber K. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy* 2015; 70:1079-90.
153. Bircher AJ, Van MG, Haller E, Curty B, Frei PC. IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:367-74.
154. Ghunaim N, Gronlund H, Kronqvist M, Gronneberg R, Soderstrom L, Ahlstedt S, van Hage-Hamsten M. Antibody profiles and self-reported symptoms to pollen-related food allergens in grass pollen-allergic patients from northern Europe. *Allergy* 2005; 60:185-91.
155. Hofmann A, Burks AW. Pollen food syndrome: update on the allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008; 8:413-7.
156. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, de Vries SC, Gautier MF, Ciurana CL, Verbeek E, Mohammadi T, Knul-Brettlova V, Akkerdaas JH, Bulder I, Aalberse RC, van RR. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122:20-32.

BIBLIOGRAFÍA

157. Garcia Ortiz JC, Cosmes PM, Lopez-Asunsolo A. Allergy to foods in patients monosensitized to *Artemisia* pollen. *Allergy* 1996; 51:927-31.
158. Zuidmeer L, van RR. Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7:269-73.
159. Gadermaier G, Harrer A, Girbl T, Palazzo P, Himly M, Vogel L, Briza P, Mari A, Ferreira F. Isoform identification and characterization of Art v 3, the lipid-transfer protein of mugwort pollen. *Mol Immunol* 2009; 46:1919-24.
160. San Miguel-Moncin M, Krail M, Scheurer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, Cistero-Bahima A, Vieths S. Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy* 2003; 58:511-7.
161. Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Conti A, Ispano M, Fortunato D, Bengtsson A, Bianchi M. Hypersensitivity to mugwort (*Artemisia vulgaris*) in patients with peach allergy is due to a common lipid transfer protein allergen and is often without clinical expression. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:310-7.
162. Enrique E, Cistero-Bahima A, Bartolome B, Alonso R, San Miguel-Moncin MM, Bartra J, Martinez A. *Platanus acerifolia* pollinosis and food allergy. *Allergy* 2002; 57:351-6.
163. Asero R. Co-recognition of lipid transfer protein in pollen and foods in northern Italy: clinician's view. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2010; 42:205-8.
164. Miralles JC, Caravaca F, Guillen F, Lombardero M, Negro JM. Cross-reactivity between *Platanus* pollen and vegetables. *Allergy* 2002; 57:146-9.
165. Enrique E, Utz M, de Mateo JA, Castello JV, Malek T, Pineda F. Allergy to lipid transfer proteins: cross-reactivity among pomegranate, hazelnut, and peanut. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96:122-3.
166. Flores E, Cervera L, Sanz ML, Diaz-Perales A, Fernandez J. Plant food allergy in patients with pollinosis from the Mediterranean area. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 159:346-54.
167. Hartz C, San Miguel-Moncin MM, Cistero-Bahima A, Fotisch K, Metzner KJ, Fortunato D, Lidholm J, Vieths S, Scheurer S. Molecular characterisation of Lac s 1, the major allergen from lettuce (*Lactuca sativa*). *Mol Immunol* 2007; 44:2820-30.
168. Van Winkle RC, Chang C. The biochemical basis and clinical evidence of food allergy due to lipid transfer proteins: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014; 46:211-24.
169. Scala E, Till SJ, Asero R, Abeni D, Guerra EC, Pirrotta L, Paganelli R, Pomponi D, Giani M, De PO, Cecchi L. Lipid transfer protein sensitization: reactivity profiles and clinical risk assessment in an Italian cohort. *Allergy* 2015; 70:933-43.
170. Palacin A, Gomez-Casado C, Rivas LA, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, Blanco C, Carrillo T, Cuesta-Herranz J, de FC, Alvarez-Eire GG, Fernandez FJ, Gamboa P, Munoz R, Sanchez-Monge R, Sirvent S, Torres MJ, Varela-Losada S, Rodriguez R, Parro V, Blanca M, Salcedo G, Diaz-Perales A. Graph based study of allergen cross-reactivity of plant

BIBLIOGRAFÍA

- lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study. *PLoS One* 2012; 7:e50799.
171. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. Relationship between peach lipid transfer protein specific IgE levels and hypersensitivity to non-Rosaceae vegetable foods in patients allergic to lipid transfer protein. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92:268-72.
 172. Novembre E, Mori F, Contestabile S, Rossi ME, Pucci N. Correlation of anti-Pru p 3 IgE levels with severity of peach allergy reactions in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012; 108:271-4.
 173. Asero R. In patients with LTP syndrome food-specific IgE show a predictable hierarchical order. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2014; 46:142-6.
 174. Pastorello EA, Farioli L, Stafylaraki C, Mascheri A, Scibilia J, Pravettoni V, Primavesi L, Piantanida M, Nichelatti M, Asero R. Anti-rPru p 3 IgE levels are inversely related to the age at onset of peach-induced severe symptoms reported by peach-allergic adults. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 162:45-9.
 175. Helbling A, Schwartz HJ, Lopez M, Lehrer SB. Lettuce and carrot allergy: are they related? *Allergy Proc* 1994; 15:33-8.
 176. Franck P, Kanny G, Dousset B, Nabet P, Moneret-Vautrin DA. Lettuce allergy. *Allergy* 2000; 55:201-2.
 177. Escudero A, Bartolome B, Sanchez-Guerrero IM, Palacios R. Lettuce and chicory sensitization. *Allergy* 1999; 54:183-4.
 178. Vila L, Sanchez G, Sanz ML, Dieguez I, Martinez A, Palacios R, Martinez J. Study of a case of hypersensitivity to lettuce (*Lactuca sativa*). *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1031-5.
 179. Olive-Perez A, Pineda F. Anaphylactic reaction to 'Tudela' lettuce hearts. *Allergy* 2003; 58:1205-6.
 180. Bascones O, Rodriguez-Perez R, Juste S, Moneo I, Caballero ML. Lettuce-induced anaphylaxis. Identification of the allergen involved. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19:154-7.
 181. Alonso MD, Martin JA, Cuevas M, Parra F, Lezaun A, Conde SL, Guimaraens MD, Losada E. Occupational protein contact dermatitis from lettuce. *Contact Dermatitis* 1993; 29:109-10.
 182. Hausen BM, Andersen KE, Helander I, Gensch KH. Lettuce allergy: sensitizing potency of allergens. *Contact Dermatitis* 1986; 15:246-9.
 183. Krook G. Occupational dermatitis from *Lactuca sativa* (lettuce) and *Cichorium* (endive). Simultaneous occurrence of immediate and delayed allergy as a cause of contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 1977; 3:27-36.
 184. Friis B, Hjorth N, Vail JT, Jr., Mitchell JC. Occupational contact dermatitis from *Cichorium* (chicory, endive) and *Lactuca* (lettuce). *Contact Dermatitis* 1975; 1:311-3.

BIBLIOGRAFÍA

185. Fregert S, Sjoborg S. Unsuspected lettuce immediate allergy in a case of delayed metal allergy. *Contact Dermatitis* 1982; 8:265.
186. Veien NK, Hattel T, Justesen O, Norholm A. Causes of eczema in the food industry. *Derm Beruf Umwelt* 1983; 31:84-6.
187. Helander I. Contact dermatitis to lettuce. *Contact Dermatitis* 1984; 11:249.
188. Jovanovic M, Poljacki M. [Compositae dermatitis]. *Med Pregl* 2003; 56:43-9.
189. Oliwiecki S, Beck MH, Hausen BM. Compositae dermatitis aggravated by eating lettuce. *Contact Dermatitis* 1991; 24:318-9.
190. Paulsen E, Andersen KE, Hausen BM. Sensitization and cross-reaction patterns in Danish Compositae-allergic patients. *Contact Dermatitis* 2001; 45:197-204.
191. Mitchell D, Beck MH, Hausen BM. Contact sensitivity to lettuce in a chef. *Contact Dermatitis* 1989; 20:398-9.
192. Gottschalk G, Todd G. Lettuce allergy. *Current Allergy and Clinical Immunology* 18(3)[2005], 144-6. 2017.
193. Paulsen E, Andersen KE. Lettuce contact allergy. *Contact Dermatitis* 2016; 74:67-75.
194. Paulsen E. Systemic allergic dermatitis caused by sesquiterpene lactones. *Contact Dermatitis* 2017; 76:1-10.
195. Cadot P, Kochuyt AM, Deman R, Stevens EA. Inhalative occupational and ingestive immediate-type allergy caused by chicory (*Cichorium intybus*). *Clin Exp Allergy* 1996; 26:940-4.
196. Gelis S, Estes O, Guilarte M, Luengo O, Labrador-Horrillo M, Cardona V. Lettuce allergy: cross-reactivity among varieties and sensitization profiles. *Allergy* 66[Supple 94], 385-6. 2011.
197. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. Detection of some safe plant-derived foods for LTP-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 144:57-63.
198. Alonso R, Enrique E, Pineda F, Basagana M, San Miguel-Moncin MM, Bartra J, Palacios R, Cistero-Bahima A. An observational study on outgrowing food allergy during non-birch pollen-specific, subcutaneous immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 143:185-9.
199. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350-4.
200. Niemeijer NR, Goedewaagen B, Kauffman HF, de Monchy JG. Optimization of skin testing. I. Choosing allergen concentrations and cutoff values by factorial design. *Allergy* 1993; 48:491-7.

BIBLIOGRAFÍA

201. Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006; 38:232-6.
202. Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:7-13.
203. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, Mueller MW. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1443-9.
204. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
205. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
206. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350-4.
207. Cuesta-Herranz J, Pastor C, Figueredo E, Vidarte L, De las HM, Duran C, Fernandez-Caldas E, de MJ, Vivanco F. Identification of Cucumisin (Cuc m 1), a subtilisin-like endopeptidase, as the major allergen of melon fruit. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:827-33.
208. Pastor C, Cuesta-Herranz J, Cases B, Perez-Gordo M, Figueredo E, De las HM, Vivanco F. Identification of major allergens in watermelon. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149:291-8.
209. Cases B, Pastor-Vargas C, Dones FG, Perez-Gordo M, Maroto AS, De las HM, Vivanco F, Cuesta-Herranz J. Watermelon profilin: characterization of a major allergen as a model for plant-derived food profilins. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 153:215-22.
210. Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, Sodergren E, Dahlstrom J, Lindner T, Sigurdardottir ST, McBride D, Keil T. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1210-8.
211. Chafen JJ, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Maglione M, Suttrop MJ, Sundaram V, Paige NM, Towfigh A, Hulley BJ, Shekelle PG. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. *JAMA* 2010; 303:1848-56.
212. Rance F, Juchet A, Bremont F, Dutau G. Correlations between skin prick tests using commercial extracts and fresh foods, specific IgE, and food challenges. *Allergy* 1997; 52:1031-5.
213. Sanchez-Lopez J, Tordesillas L, Pascal M, Munoz-Cano R, Garrido M, Rueda M, Vilella R, Valero A, Diaz-Perales A, Picado C, Bartra J. Role of Art v 3 in pollinosis of patients allergic to Pru p 3. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:1018-25.

BIBLIOGRAFÍA

214. Javaloyes G, Goikoetxea MJ, Garcia N, I, Aranda A, Sanz ML, Blanca M, Diaz PA, da SJ, Esparza I, del P, V, Blazquez AB, Scheurer S, Vieths S, Ferrer M. Pru p 3 acts as a strong sensitizer for peanut allergy in Spain. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130:1432-4.
215. Fernandez-Rivas M. Fruit and vegetable allergy. *Chem Immunol Allergy* 2015; 101:162-70.
216. Uasuf CG, Villalta D, Conte ME, Di SC, Barrale M, Cantisano V, Pace E, Gjomarkaj M, Gangemi S, Brusca I. Different co-sensitizations could determine different risk assessment in peach allergy? Evaluation of an anaphylactic biomarker in Pru p 3 positive patients. *Clin Mol Allergy* 2015; 13:30.
217. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3381-5.
218. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006; 22:195-201.
219. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18:2714-23.
220. Schaller A, Ryan CA. Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. *Plant Mol Biol* 1996; 31:1073-7.
221. Guevara MG, Almeida C, Mendieta JR, Faro CJ, Verissimo P, Pires EV, Daleo GR. Molecular cloning of a potato leaf cDNA encoding an aspartic protease (StAsp) and its expression after *P. infestans* infection. *Plant Physiol Biochem* 2005; 43:882-9.
222. Hoffmann-Sommergruber K, Mills EN. Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395:25-35.